

Elektrische Kenngrößen für die elektroporative Wirkstoff-Einschleusung und den DNA- Transfer in Zentrifugal-Aggregate von CHO- Zellen als Gewebemodell

Marco Schmeer

aus Halle / Westf.

***Elektrische Kenngrößen für die elektroporative
Wirkstoff-Einschleusung und den DNA-
Transfer in Zentrifugal-Aggregate von CHO-
Zellen als Gewebemodell***

**Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
an der Universität Bielefeld**

von
Marco Schmeer
aus Halle / Westf.

Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.2004

Vorsitzender: Prof. Dr. P. Jutzi
1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Neumann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. T. Koop

Meiner Großmutter Elfriede, † 19.08.04

Teile dieser Arbeit sind

- veröffentlicht:

Pliquett, U., Schmeer, M., Seipp, T., Neumann, E., „Fast recovery process after electroporation“, *IFMBE Proc*, **3,1**, 2002, 98-99.

Schmeer, M., Seipp, T., Pliquett, U., Kakorin, S., and Neumann, E., „Mechanism for the conductivity changes caused by membrane electroporation of CHO cell – pellets“, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **6**, 2004, 5564-5574.

- als Gebrauchsmuster geschützt:

Neumann, E., Pliquett, U., Seipp, T., Schmeer, M., „Biokompatible Elektroden für in vivo Elektroporation zur Wirkstoffzufuhr“, *Gebrauchsmuster*, Nr. 203 02 861.9, 2003.

INHALT

ZUSAMMENFASSUNG	1
I. EINLEITUNG	3
ZIELSETZUNG UND MOTIVATION	5
ELEKTROPORATION	5
II. MATERIAL UND METHODEN	8
(1) Elektroporatoren	8
(2) Pulsammern	10
(3) Farbstoffe	12
SERVA Blau G	12
Propidiumiodid	12
(4) Das Zellsystem	13
(5) Präparation der Zellen für die Elektroporation	14
(6) Zellpellets	15
(7) Elektroporative Zellfärbung (Farbstoffmethode)	15
Elektropermeabilisierung	15
Transiente Permeabilisierbarkeit und Überleben	15
Populationsausheilkinetik	16
Auswertung der Zellfärbung	16
(8) Beschichtung der Elektroden	16
(9) Messung der optischen Absorption (Absorbanz)	17
(10) Elektroporation adhärenter Zellen	17
(11) Aufnahme von Impedanzspektren	18
(12) Elektroporativer DNA-Transfer in CHO-Zellen	18
(13) Elektroporative Zellfusion	19
CHO – Fusion	19
Fusion von <i>Dictyostelium discoideum</i>	19
III. ERGEBNISSE	20
(1) Abhängigkeit der feldpulsinduzierten Permeabilisierbarkeit von der Zelldichte	20
(2) Leitwertmessungen	21
(2.1) Die Leitfähigkeit von Zellpellets ist abhängig von Packungsdichte	22
(2.2) Größenverteilung der CHO-Zellen	22
(2.3) Leitwertmessungen während und nach Feldpulsapplikation	23
(2.4) Einfluß der Medienzusammensetzung auf Leitfähigkeitsänderungen im Ein- und Ausfeld	25
(2.5) Temperaturabhängigkeiten der Poren-Bildung	25

(3)	Impedanzspektren vor und nach Feldpulsapplikation	26
(4)	Elektroporative Zellfärbung	27
(4.1)	Pulsdauerabhängigkeit der elektroporativen Zellfärbung	27
(4.2)	Nachfeld-Porenausheilung und Zellfärbung	28
(5)	Austritt von Polynucleotiden aus den Zellen	29
(6)	Elektrodeneffekte	29
(6.1)	Elektroporative Zellfärbung	29
(6.2)	Elektrodeneffekte bei Leitfähigkeitsmessungen	31
(6.3)	Agarosebeschichtung bei Nadel-Einstichelektroden	33
(7)	Elektroporativer DNA-Transfer in CHO-Zellen	34
(7.1)	Probenpräparation	34
(7.2)	Auswahl der optimalen Pulsparameter	35
(7.3)	Ermittlung der einzusetzenden DNA-Konzentration	36
(7.4)	Verwendung von Edelstahlelektroden	36
(7.5)	Einfluß des interstitiellen Mediums	37
(7.6)	Packungsdichte der Zellen	40
(7.7)	Pulsform und Transfektionsergebnis	42
(8)	Zellfusion	43
(8.1)	CHO-Fusion	43
(8.2)	Fusion von <i>Dictyostelium discoideum</i>	44
IV.	DATENANALYSE UND DISKUSSION	45
(1)	Abhängigkeit der feldpulsinduzierten Permeabilisierbarkeit von der Zelldichte	45
(2)	Leitfähigkeitsänderungen	46
(2.1)	Leitfähigkeitsänderungen während Feldpulsapplikation	46
	Leitfähigkeitsrelaxationen im elektrischen Feld	46
	Allgemeine chemische Elektrothermodynamik	51
	Elektrothermodynamik gekoppelter Porierungsschritte	51
	Membranleitfähigkeit λ_m von Zellen im Pellet	59
	Alternative Deutungen der Leitfähigkeitsrelaxationen	66
(2.2)	Nachfeld – Leitfähigkeitsänderungen	69
(2.3)	Einfluß der Medienzusammensetzung auf Leitfähigkeitsänderungen im Ein- und Ausfeld	70
(2.4)	Temperaturabhängigkeiten von Poren - Bildung und –Ausheilung	72
(3)	Impedanzspektrometrie vor und nach Feldpulsapplikation	76
(4)	Elektroporative Zellfärbung	80
(4.1)	Pulsdauerabhängigkeit der elektroporativen Anfärbbarkeit u. d. Leitfähigkeitsänderungen	80
(4.2)	Ermittlung der Porenausheilkinetik durch elektroporativen Farbstofftransfer	81
(5)	Zusammenstellung mehrerer Methoden / Effekte	82
(6)	Elektrodeneffekte	83
(6.1)	Elektroporation adhärenter Zell-Oligoschichten	86

(6.2)	Elektrodenbeschichtung und elektroporative Anfärbbarkeit	86
(6.3)	Elektrodenbeschichtung und Leitfähigkeitsänderungen	86
(6.4)	Elektrodenbeschichtung bei Nadel-Einstichelektroden	87
(7)	Elektroporativer DNA-Transfer in CHO-Zellen	88
(7.1)	Probenpräparation	88
(7.2)	Auswahl der optimalen Pulsparameter	88
(7.3)	Ermittlung der einzusetzenden DNA-Konzentration	89
(7.4)	Verwendung von Edelstahlelektroden	89
(7.5)	Einfluß des interstitiellen Mediums	90
(7.6)	Einfluß der Packungsdichte der Zellen	92
(7.7)	Pulsform und Transfektionsergebnis	93
(8)	Schlußfolgerungen für die elektroporative Zellfusion	93
	LITERATUR	95
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	100
	DANKSAGUNG	103

ZUSAMMENFASSUNG

Die elektroporative Einschleusung von makromolekularen Farbstoffen in Chinese Hamster Ovary (CHO) – Zellen hoher Packungsdichte und die elektrischen Leitfähigkeitsänderungen der Zellen zeigen an, daß sich Membran-Elektroporen bilden und wieder ausheilen.

Dabei zeigt sich, daß die Packungsdichte der Zellen einen entscheidenden Einfluß auf die feldinduzierte Membranporenbildung und damit auf den Transport von Ionen bzw. Makromolekülen durch die Membran hat. Denn sowohl die Leitfähigkeitmessungen als auch die Experimente zum elektroporativen Farbstofftransfer ergeben bei einer Erhöhung der Packungsdichte ausgehend von Zellsuspensionen bis hin zu dichter Kugelpackung eine Verringerung des elektroporativen Transportes durch die Membran. Eine Ursache hierfür ist die Verringerung der Membranfeldstärke E_m , eine dichte Kugelpackung verringert E_m maximal um einen Faktor $2/3$. Der Transfektionserfolg, also die elektroporative Einschleusung von DNA in die Zellen, wird jedoch durch eine *lose* Packung der Zellen in Gegenwart von DNA um einen Faktor 1,5 erhöht, aufgrund einer Verringerung der irreversiblen Zellschädigung gegenüber der Suspension und einer Erhöhung der lokalen DNA-Konzentration.

Aus der Analyse der gemessenen Leitfähigkeitsänderungen der Zellpellets während und nach Feldpulsapplikation lassen sich im wesentlichen zwei Porenzustände deutlich unterschiedlicher Bildungs- und Ausheilkinetik und unterschiedlicher Transporteigenschaften ableiten. Die relativen Leitfähigkeitsänderungen während der Feldpulsapplikation weisen drei separierbare Anteile (kinetische Normalmoden) auf. Zur ersten, sehr schnellen Mode tragen Wien-Effekte, d.h. die Verschiebung der Ionenatmosphäre und die Dissoziation von Ionenpaaren an der Zelloberfläche bei. Die zweite und dritte Mode lassen sich in die jeweiligen Membranleitfähigkeits-Moden umformulieren. Die elektrothermodynamische Analyse bzgl. struktureller Übergänge geschlossener (C) in porierte (P) Membranzustände sehr unterschiedlicher Lebensdauern nach dem Schema $(C \rightleftharpoons C_1) \rightleftharpoons (P_2 \rightleftharpoons P_3)$ ergibt die mittleren Porenradien $\bar{r}_{p,2} = 1,00 (\pm 0,05)$ nm für P_2 -Poren der zweiten Phase und $\bar{r}_{p,2} = 1,5 (\pm 0,1)$ nm für die P_3 -Poren der dritten Phase bei $T = 293$ K (20° C). Die Relaxationszeit τ_2 der Phase 2 spiegelt jedoch den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt $C \rightleftharpoons C_1$ wider, verbunden mit einem Aktivierungs-Dipolmoment $\Delta m_1 = 63 \cdot 10^{-30}$ Cm (19 Debye) für die Orientierungsänderung der dipolaren Lipid-Kopfgruppen in der Lipid-Wasser-Grenzfläche. Dieser Dipolprozeß geht der eigentlichen Porenbildung voraus. Aus der Analyse ergeben sich weiterhin die Feldabhängigkeiten der jeweiligen Porenfraktionen f_2 und f_3 (in der Größenordnung 10^{-3}), der

Feldreduktionsfaktor $f_{\lambda,i} \leq 1$ und die feldinduzierte Transmembranspannung U_m . Außerdem erhält man die Ausfeld-Porenleitfähigkeiten $\lambda_{p,2}^0 = 1,7 \cdot 10^{-2}$ mS/cm (P_2) und $\lambda_{p,3}^0 = 0,1$ mS/cm (P_3) und die Membranleitfähigkeit $\lambda_m^0 = 0,032$ μ S/cm.

Die Nachfeld-Leitfähigkeitsänderungen, hervorgerufen durch die langlebigen P_3 -Poren, werden anhand zeit- und feldabhängiger Effluxkoeffizienten analysiert. Die charakteristische Nachfeld-Ausheilzeit, $\tau_R = \tau_3^0 = 45 (\pm 3)$ s bei 20 °C, ist unabhängig von der Feldstärke des Feldpulses und vom Elektrodenabstand. Die gleiche Ausheilzeit erhält man auch anhand von Experimenten zum elektroporativen Transfer makromolekularer Farbstoffe in die Zellen. Die P_3 -Poren sind offensichtlich diejenigen Poren, die den für die Anwendung der Methode interessanten Transmembrantransport von Ionen und Makromolekülen zulassen.

Der analysierbare Leitfähigkeitsanstieg im Ausfeld-Bereich ist bei extrazellulären Medien höherer Ionenstärke schwächer ausgeprägt, da hier die Zellen anschwellen. Die Strukturänderungen der Porenöffnung und -Ausheilung sind sowohl temperatur- als auch feldstärkeabhängig.

Impedanzmessungen vor und nach Feldpulsapplikation liefern zusätzliche Informationen. Anhand des Abfalls der zum Volumenanteil der Zellen mit intakten Membranen proportionalen Größe P_y kann hier auch die irreversible Schädigung einiger Zellen aufgrund des Feldpulses beobachtet werden. Das Absterben dieser Zellen ist offensichtlich ein Nachfeld-Effekt.

Insbesondere bei Anordnungen, bei denen das Zellmaterial unmittelbaren Elektrodenkontakt hat, treten aufgrund von Elektrodeneffekten vermehrt irreversible Zellschädigungen auf. Außer dem nachweislich erhöhten Potentialabfall in Elektrodennähe wirken sich Wasserstoff und Sauerstoff *in statu nascendi* bzw. andere Redoxprozesse und Metallionen von der Anode zellschädigend aus. Diese Effekte können durch Beschichtung der Elektroden mit einem dünnen Agarosegel deutlich verringert werden.

Bei der elektroporativen Transfektion können Elektrodeneffekte auch hilfreich sein. Hier dienen positiv geladene Ionen zur Vermittlung des DNA-Membrankontaktes. Bei Verwendung von Aluminiumelektroden setzen diese offensichtlich so viel Al^{3+} frei, daß auf den Zusatz von Elektrolyt verzichtet werden kann. Die elektroporativ in die Zellen eingeschleusten Ionen können aber auch zu irreversibler Schädigung führen.

Zellaggregate sind auch bei der elektroporativen Zellfusion anwendbar.

Die gewonnenen Erkenntnisse sind von essentieller Bedeutung für die Optimierung elektrischer Feldpulsparameter, z.B. beim klinischen Elektrotransfer bioaktiver Substanzen oder DNA in biologisches Material hoher Zelldichte (Gewebe).

I. EINLEITUNG

Zellmembranen bestehen aus Lipiddoppelschichten, in die Proteine unterschiedlicher Funktionen eingelagert sind. Sie stellen eine semipermeable Schutzhülle für die Zelle dar. Einige für die Zellfunktion essentielle Moleküle oder Wasser können die Membran passieren, für die meisten Moleküle wie Proteine, Nukleinsäuren oder auch viele Wirkstoffe ist sie jedoch undurchlässig. Das Passieren der Membran ist dann meist an protein-gebundene Transportmechanismen gekoppelt.

Erste Untersuchungen zur Wirkung elektrischer Felder auf Membranen von Protoplasten stammen von SALE und HAMILTON (1967). Diese beobachteten, daß kurze elektrische Feldpulse oberhalb einer kritischen Feldstärke zur (irreversiblen) Lyse der Zellen führen.

NEUMANN und ROSENHECK zeigten 1972, daß es möglich ist, Zellorganellen durch elektrische Feldpulse transient und reversibel zu permeabilisieren. Eine solche elektrisch induzierte Porenbildung bezeichnet man heute als Elektroporation. Diese Methode hat sich mittlerweile zu einem der Standardverfahren beim direkten Transfer nackter DNA in lebende Zellen entwickelt [NEUMANN et al., 1982 und z.B. DJUZEOVA et al., 1996].

In der sogenannten Elektrochemotherapie ist es möglich, Chemotherapeutika durch Membranelektroporation (MEP) direkt in das Tumorgewebe einzubringen [HELLER et al., 1996; MIR et al., 1996]. Dieses Verfahren befindet sich zur Zeit in der klinischen Erprobung.

Die elektroporative Gentherapie verfolgt Ansätze zum Einschleusen von DNA in Zellen im Gewebe [JAROSZESKI et al., 1999] durch Elektroporation mit dem Ziel einer induzierten und kontrollierten Apoptose bzw. der Reparatur genetischer Defekte.

Gegenstand aktueller Untersuchungen ist die Optimierung der Elektroporationsparameter, wie z.B. Feldstärke, Pulsdauer, Pulszahl. Diese sind für jedes System je nach Zellgröße anders zu wählen, mit dem Ziel, insbesondere bei Zellen im Gewebe eine möglichst hohe Anzahl transient permeabilisierter Zellen zu erreichen. Das sind diejenigen Zellen, die feldpulsinduziert Poren bilden, ohne irreversibel geschädigt zu werden. Besonders bei der Elektroporation von Gewebe kann die irreversible Schädigung einiger Zellen zu negativen Nebenwirkungen führen, da neben nekrotischen Veränderungen die Bildung von Geschwüren und Wunden auftreten kann [MIKLAVCIC et al., 2000].

Ein besonderes Interesse gilt weiterhin der Aufklärung des molekularen Mechanismus der feldinduzierten Porenbildung, was auch im Hinblick auf eine Steigerung der Effektivität des Transfers von Makromolekülen in Zellen von besonderer Bedeutung ist.

Wichtige Kenngrößen der Bildung und Ausheilung von Membranporen können anhand von Leitwertmessungen während und nach Feldpulsapplikation [KINOSITA et al., 1979; GRIESE et al., 2002; TÖNSING et al., 2000; PLIQUETT et al., 2004], sowie elektroporativem Transfer makromolekularer Farbstoffe und Untersuchungen des Transfektionsergebnisses nach elektroporativem DNA-Transfer [NEUMANN et al., 1982; DJUZEOVA et al., 1996] ermittelt werden.

In der vorliegenden Arbeit werden dicht-gepackte Aggregate von Säugerzellen (CHO) untersucht, als Referenz dienen entsprechende Zellsuspensionen.

Zellaggregate wurden auch schon von ABIDOR et al. (1994) elektrisch untersucht. Die dort verwendete Meßkonfiguration mit Zellaggregaten auf einer der Elektroden, wobei sich die andere Elektrode im Überstand befindet, entspricht jedoch nicht den Verhältnissen bei der Elektroporation von Gewebe. Als Modellsystem wird von uns eine Konfiguration ohne Überstand gewählt, bei der sich das Zellaggregat direkt zwischen den Elektroden befindet. Neben dem Einfluß der dichten Packung können so Einflüsse der Elektrodenoberflächen auf die feldinduzierte Porenbildung und die Viabilität der Zellen studiert werden. Solche Effekte sind bei Arbeiten mit Zellsuspensionen weniger problematisch, bei Gewebe befinden sich jedoch ebenso wie bei den hier betrachteten einfachen Modellsystemen sehr viele Zellen in unmittelbarer Nähe der Elektroden. Elektrodeneffekte können einen signifikanten Einfluß auf das Elektroporationsergebnis haben. Dies ist im Gewebe ein wichtiger Aspekt, denn beispielsweise in der Gentherapie ist es von entscheidender Bedeutung, einen hohen Anteil transfizierter Zellen bei geringer Schädigung zu erhalten.

Ansätze zur – insbesondere heterozygoten – elektroporativen Fusion von Säugerzellen werden aktuell im Rahmen der Tumervaccinisierung [SCOTT-TAYLOR et al., 2000; KUGLER et al., 2000] untersucht. Im Hinblick auf die Bereitstellung von Säuger-zellfusionaten in großer Anzahl stellt die Herstellung von Zell-Zell-Kontakten durch Zentrifugation zur elektroporativen Zellfusion ebenfalls eine geeignete Methode dar.

Weiterhin bietet die Beobachtung von Fusionaten eine gegenüber Einzelzellen verbesserte Möglichkeit, dynamische intrazelluläre Vorgänge wie beispielsweise Bewegungsmuster von Zellorganellen zu beobachten. Der zur Zellfusion notwendige Zell-Zell-Kontakt ist bei den hier untersuchten Zellpellets aufgrund der hohen Packungsdichte gegeben.

ZIELSETZUNG UND MOTIVATION

Während bereits vielfältige Studien an suspendierten Einzelzellen durchgeführt wurden, sind Untersuchungen an Zellverbänden und Gewebe allenfalls Gegenstand der aktuellen Forschung. Erkenntnisse, die an einzelligen Systemen gewonnen wurden, sind sicherlich teilweise auch auf Zellverbände übertragbar, andererseits sind hier auch signifikante Unterschiede zu erwarten. Im Rahmen derartiger Fragestellungen soll eine Art Brücke zwischen suspendierten Einzelzellen auf der einen und Zellgewebe auf der anderen Seite geschaffen werden. Hierzu soll die Untersuchung von Einzelzellen dienen, die in einen engen Kontakt gebracht wurden.

Anhand von Leitfähigkeitsmessungen während und nach Feldpulsapplikation sollen die Bildung und Ausheilung feldpulsinduzierter Membranporen verfolgt werden. Die Etablierung eines solchen Verfahrens hat insbesondere im Hinblick auf klinische Anwendungen den Vorteil, daß unmittelbar nach Feldpulsapplikation Aussagen über das Vorhandensein von Membranporen gemacht werden können. Die Möglichkeit, aus solchen Leitfähigkeitsuntersuchungen Rückschlüsse bezüglich der Wahl der Feldpuls-Parameter zum elektroporativen Transfer von Makromolekülen zu ziehen, soll hier ebenfalls untersucht werden. Dazu dienen Untersuchungen zum elektroporativen Farbstoff- und DNA-Transfer.

Weiterhin soll der Einfluß von Elektrodeneffekten auf die Zellen bei Applikation elektrischer Feldpulse untersucht werden.

Ferner soll geklärt werden, ob sich die Zellaggregate zur Herstellung feldpulsinduzierter Zellfusionate eignen.

ELEKTROPORATION

Elektrische Felder der Feldstärke \vec{E} wirken auf Ladungen, d.h. auf freie Ionen, Dipole und polarisierbare Gruppen. Somit sind sie in der Lage, Moleküle und Molekülverbände strukturell zu verändern. Eine solche feldinduzierte Veränderung der Struktur von Lipidmembranen nutzt man bei der Elektroporation. Hierbei handelt es sich jedoch um einen indirekten Feldeffekt, die Änderung $\Delta\xi$ der Membranstruktur steht am Ende einer Folge von Vorprozessen.

Eine Membran bildet eine isolierende Schicht zwischen dem elektrolytischen Zellinneren und dem ebenfalls leitfähigen umgebenden Medium. Somit liegen zwei Grenzflächen zwischen Medien unterschiedlicher Dielektrizitätszahl vor.

Ein extern angelegtes elektrisches Feld E führt zunächst zu Grenzflächenpolarisationen. Diese induzieren eine elektrische Potentialdifferenz $\Delta\varphi_{\text{ind}}$ über die Membran. Dieser Effekt liefert den größten Beitrag zum tatsächlichen elektrischen Feld E_m innerhalb der Membran. Die Strukturumwandlung der Membran steht am Ende der Kaskade und erfolgt demnach zeitlich verzögert [NEUMANN et al., 1989].

$$E \rightarrow \Delta\varphi_{\text{ind}} \rightarrow \Delta\xi \quad (\text{I.1})$$

Abb.I.1 zeigt die Grenzflächenpolarisation vor und nach Anlegen eines externen elektrischen Feldes.

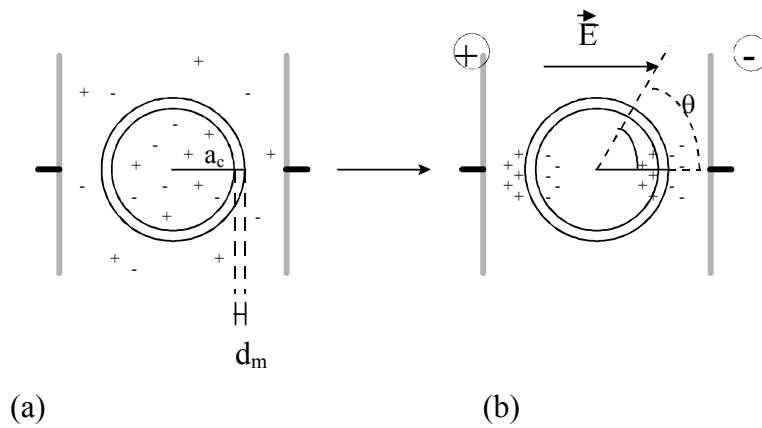


Abb.I.1: Sphärische Modellzelle mit Radius a_c und Membrandicke d_m und Ladungsverteilung (a) vor und (b) nach Anlegen eines externen elektrischen Feldes; θ gibt den Winkel zwischen der betrachteten Membranstelle und der Richtung dem externen elektrischen Feld an.

Die induzierte Transmembranpotentialdifferenz $\Delta\varphi_{\text{ind}}$ verhält sich additiv zur natürlichen Transmembranpotentialdifferenz lebender Zellen $\Delta\varphi_{\text{nat}}$ [NEUMANN et al., 1999].

$$\Delta\varphi_m = \Delta\varphi_{\text{ind}} + \Delta\varphi_{\text{nat}} \quad (\text{I.2})$$

Die Zeitkonstante τ_p für den Aufbau der Grenzflächenpolarisation nach $\Delta\varphi(t) = \Delta\varphi_E(1 - \exp[-t/\tau_p])$ ist bei größeren Zellen klein gegenüber der optimalen Pulsdauer t_E , so daß bei Applikation des Feldpulses nur der stationäre Wert der Trans-membranpotentialdifferenz $\Delta\varphi_{\text{ind}}(E)$ maßgeblich ist. τ_p ist abhängig von den Leitfähigkeiten des Zellinneren, des umgebenden Mediums und der Membran [SCHWAN, 1957].

Die durch das externe elektrische Feld induzierte Bildung von Membranporen kann genutzt werden, um Substanzen, die andernfalls nicht in der Lage sind, die Membran zu permeieren, in die Zellen einzuschleusen.

II. MATERIAL UND METHODEN

(1) Elektroporatoren

Zur Erzeugung elektrischer Feldpulse dienen sogenannte Elektroporatoren. Im einfachsten Fall verfügen diese über einen Kondensator, welcher über einen Ladewiderstand auf eine Ausgangsspannung U_0 geladen wird. Die anschließende Entladung erfolgt über die Pulschammer. Die elektrische Feldstärke des Pulses ergibt sich aus der Spannung U bzw. der Potentialdifferenz $\Delta\varphi = -U$ und dem Elektrodenabstand l nach:

$$E = \frac{U}{l} = -\frac{\Delta\varphi}{l} \quad (\text{II.1})$$

Bei Kondensatoren vernachlässigbar kleiner Induktivität ist der zeitliche Verlauf des Feldpulses eine abfallende Exponentialfunktion.

$$E(t) = E_0 \cdot e^{-t/\tau_E} \quad (\text{II.2})$$

Die Zeitkonstante τ_E der Entladung ergibt sich aus der Kapazität C_K des Kondensators und dem Widerstand R der Lösung nach:

$$\tau_E = R \cdot C_K \quad (\text{II.3})$$

Zur Erzeugung von Quasirechteckpulsen dient der Elektroporator II der Firma DIALOG, Düsseldorf, welcher hier für Forschungszwecke entsprechend modifiziert wurde. Die Einstellung der Pulsparameter und die Aufnahme der Strom- und Spannungskurven erfolgen über einen angeschlossenen Computer.

Der verwendete Elektroporator verfügt über einen Kondensator mit einer Ladekapazität C_K von 200 μF . Durch vorzeitiges Abschalten der Entladung werden Quasirechteckpulse erzeugt. Hierbei können die Pulsdauer t_E in einem Bereich von 5 μs und 1 s und die applizierte Spannung U_{appl} zwischen 10 V und 1000 V gewählt werden.

Strom- und Spannungsverlauf werden von einem Oszilloskop (TEKTRONIX THS 720A, Beaverton, Oregon, USA) aufgezeichnet, mittels eines KNICK-Konduktometers Typ 600 (KNICK, Berlin) werden die Leitwertänderungen im Nachfeldbereich aufgenommen.

Die Steuerung des Elektroporators und die Meßdatenerfassung erfolgen mittels eines speziell entwickelten Computerprogramms (U. Pliquet, Universität Bielefeld) in MATLAB 5 (The Mathworks, München).

Der oben beschriebene Meßaufbau arbeitet mit einer Umschaltzeit von mehreren Sekunden zwischen Ein- und Ausfeldbereich. Gerade aus diesem Übergang ergeben sich aber

entscheidende Hinweise bezüglich des Beitrags einzelner Porenzustände zu den Leitfähigkeitsänderungen. Deshalb wurde eine weitere spezielle Meßanordnung entwickelt (U. Pliquett, Bielefeld):

Zur Applikation der Hochspannungspulse dient hier ein Elektroporator (I) (DIALOG, Düsseldorf), der technisch dem Elektroporator II ähnelt, verbunden mit dem im folgenden Abschnitt beschriebenen Vierelektroden-System.

Vor Feldpulsapplikation wird der Widerstand des Zellsystems mittels eines Sinus-Signals der Frequenz 2 kHz und einer Strom-Amplitude von 10 μ A gemessen. Als Spannungsquelle dient hier der geladene Hochspannungskondensator im Elektroporator, so daß auf einen Schaltvorgang zwischen Ein- und Ausfeld-Leitfähigkeitsmessungen verzichtet werden kann. Die Aufzeichnung des Stroms (I) und der Spannung an den äußeren (U_n) und inneren Elektroden (U_{in}) erfolgt über ein Digital-Oszilloskop (TDS 540D, TEKTRONIX, Beaverton, USA), die weitere Verarbeitung mit MATLAB 5 (The Mathworks, München).

Zur Fortsetzung der Messungen für einige Minuten im Nachfeld-Bereich wird eine 2 kHz-Sinuswelle appliziert (10 ms je Sekunde) und der effektive Strom sowie die Spannung (U_{in}) an den inneren Elektroden erfaßt [PLIQUETT et al., 2002].

Bei der elektroporativen Transfektion, d.h. dem Transfer von DNA in die Zellen werden Feldpuls kombinationen verwendet. Zur Erzeugung einer solchen Kombination aus Hoch- und Niederspannungspulsen dient der Scientoporator (Uwe Pliquett, Bielefeld). Dabei handelt es sich um eine komplette Neuentwicklung aus der Arbeitsgruppe Prof. Neumann. Hier einige technische Details:

Für die Applikation beliebiger Pulsformen enthält das Gerät einen unipolaren, mikroprozessorgesteuerten Arbiträr funktionsgenerator mit einer Auflösung von 12 bit und einer Bandbreite von 250 kHz. Für präzise Rampenfunktionen mit hohem Signal-Rauschabstand steht ein Analogintegrator mit Triggereinrichtung zur Verfügung. Das Analogsignal im Bereich von 0 bis 1 V wird über einen Analogoptokoppler auf eine gesteuerte Stromquelle übertragen (Strommodus). Die Stromquelle liegt an +1150 V und kann Ströme bis zu 15 A über einen Zeitbereich von 5 ms liefern. Für die Applikation spannungsgesteuerter Signale wird der Strom in einen Widerstand von 1 k Ω gespeist und die Spannung durch einen nachfolgenden Impedanzwandler an die Klemmen gelegt (Spannungsmodus). Diese Stufe kann bis zu 30 A Impulsstrom liefern. Die Umschaltung zwischen Strom- und Spannungsmodus erfolgt softwaregesteuert. Zur Vermeidung von Überlasten wird über die in den Endstufentransistoren umgesetzte Energie integriert und die Stufe bei Erreichen von 2 J abgeschaltet. Über eine

softwaregesteuerte Triggerung ist die Änderung der Pulsparameter optional bei Erreichen einer bestimmten Spannung (Strommodus) oder eines bestimmten Stroms (Spannungsmodus) möglich.

Zur Erzeugung bipolarer Signale ist der Hochspannungsstufe eine H-Brücke mit 1200V/50A – ISFETS nachgeschaltet.

Der Ausgangsstrom wird über einen induktiven Stromtransducer mit einer Zeitkonstanten von 2 s und anschließender Verstärkung gemessen. Für die Spannungsmessung wurde ein unabhängiger Hochspannungsdifferenzverstärker mit einer Bandbreite von 30 MHz implementiert, was die Verwendung eines 4-Elektrodensystems gestattet.

Die Stromversorgung der Hochspannungsstufe erfolgt mittels eines Hochspannungsgenerators, welcher einen 220 μ F – Kondensator auf 1150 V auflädt. Der Kondensator ist während des Betriebes ständig geladen und wird vor dem Ausschalten des Gerätes über eine gesteuerte Stromquelle entladen.

Für Messungen der passiv-elektrischen Eigenschaften vor und nach der Hochspannungspulsapplikation wurde eine im Zeitbereich arbeitende Impedanzmesseinrichtung mit Vierelektrodenanordnung implementiert. Einerseits besteht die Möglichkeit einer über Relais geschalteten präzisen Messeinrichtung. Hier wird über einen separaten Generator an die äußeren Elektroden eine Rechteckwelle von $\pm 100 \mu\text{A} / 2 \text{ kHz}$ appliziert und die Spannung an den inneren Elektroden gemessen. Aus der U/t – Funktion kann dann das Impedanzspektrum in einem Bereich zwischen 2 kHz und etwa 100 kHz berechnet werden. Wenn eine Impedanzmessung ohne Umschaltverzögerung nach einem Hochspannungspuls erforderlich ist, kann die Rechteckwelle über die Hochspannungsstromquelle (1,5 mA) mittels der H-Brücke erzeugt werden.

(2) Pulskammern

Die Feldpulsapplikation erfolgt über parallele Edelstahl-Plattenelektroden mit einer nominalen Oberfläche von $A = 2 \text{ cm}^2$ und variierbaren Elektrodenabständen in einer 1,5 mL Halbmikro-Polycarbonat-Photometerküvette (PLASTIBRAND, BRAND, Wertheim) in einem Temperierblock (ELEKTROPORATOR II).

Zur Durchführung von Leitfähigkeitsmessungen kann der Bereich oberhalb des zu vermessenden Zellpellets mittels eines Teflonstempels isoliert werden. Dazu wird der Teflonblock (vgl. Zeichnung) durch eine Rahmenkonstruktion ersetzt.

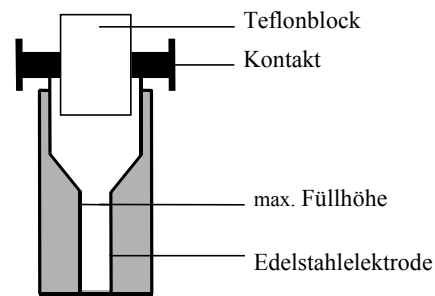


Abb. II.1: Schematische Darstellung einer Pulschammer, mit der die meisten Elektroporationsexperimente durchgeführt wurden.

Für die Leitfähigkeitsmessungen mit höherer Auflösung im Übergangsbereich zwischen Ein- und Ausfeld wird ein Vierelektroden-System verwendet, der Abstand der Edelstahl-Pulselektroden beträgt hier $l_n = 2$ mm. Im Küvettenboden werden mittels eines Silikonstopfens zwei zusätzliche Meßelektroden (Gold, $l_{in} = 1$ mm) befestigt [PLIQUETT et al, 2002].

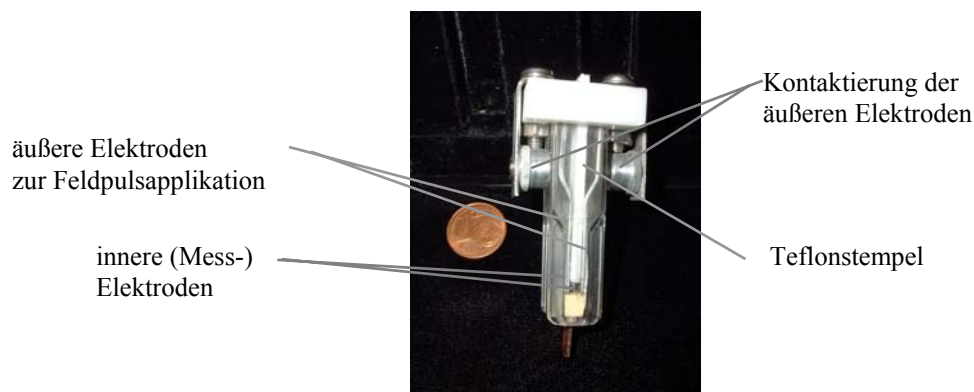


Abb. II.2: Meßküvette mit Vierelektroden-System zur Feldpulsapplikation und Leitwertmessung mit Teflon-Stempel.

Für einige Experimente zum elektroporativen DNA-Transfer werden sterile Einmal-Elektroporationsküvetten (BIO-RAD, München) mit Aluminiumelektroden verwendet. Diese sind mit unterschiedlichen Elektrodenabständen erhältlich, verwendet wird hier $l_n = 4$ mm.

(3) Farbstoffe

SERVA Blau G

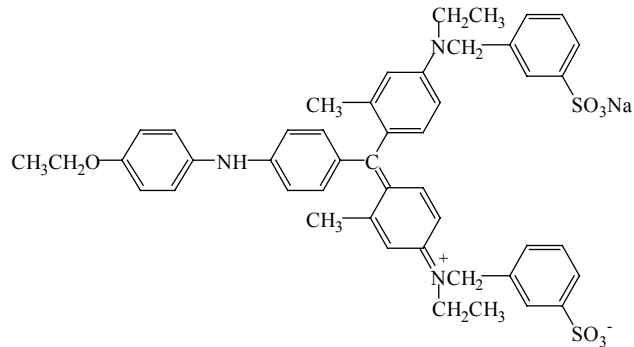


Abb. II.3: Strukturformel von Serva Blau G

SERVA Blau G (SBG, $M_r = 854$) wird als Festsubstanz von SERVA Feinchemica, Heidelberg bezogen. Es ist äquivalent zu Coomassie® Brilliant Blue G. Dieser Triphenylmethanfarbstoff bindet selektiv an Proteine und ist nicht in der Lage, intakte Zellemembranen zu durchdringen [BRADFORD, 1976].

Der Farbstoff wird als 11,7 mM (1 %) wäßrige Stammlösung vorbereitet. Zum Anfärben der Zellen wird die entsprechende Suspension mit 0,1 mL der Stammlösung je Milliliter Probe versetzt, so daß die Farbstoffkonzentration dann 1,17 mM beträgt.

Propidiumiodid

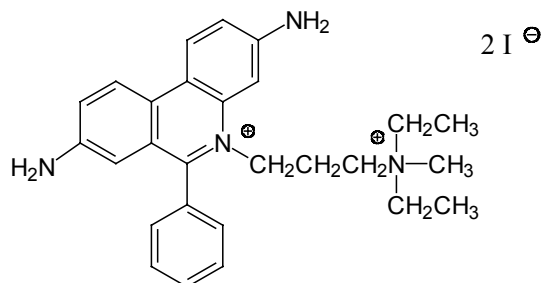


Abb. II.4: Strukturformel von Propidiumiodid

Propidiumiodid ($M_r = 668,4$; 8-Diamino-5-(3-diethylaminopropyl)-6-phenyl-phenanthridium-iodid-methiodid; Fluka, Buchs, CH) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der durch Interkalieren selektiv an Nukleinsäuren bindet.

1 mL Zellsuspension wird mit 100 μ L der Farbstoff-Stammlösung (215,6 μ M in Elektroportationsmedium) versetzt.

(4) Das Zellsystem

Die CHO-K1-Zelllinie (ATCC CCL-61) ist ein Subclon, der aus einer Eierstockbiopsie eines Chinesischen Hamsters (*Cricetulus griseus*) isolierten, somatischen CHO-Linie (engl.: Chinese Hamster Ovary). Als Säugetierzellen sind sie von einer Plasmamembran und einer Glykokalyx umgeben. Die suspendierten Zellen zeigen eine Größenverteilung mit einem mittleren Zellradius von 7,5 μ m.

Diese adhärent wachsende Zelllinie läßt sich unter sterilen Bedingungen in T-Flaschen (NUNC, Wiesbaden) oder im Bioreaktor (BIOSTAT, Braun, Melsungen) kultivieren.

Als Kulturmedium dient ein serumhaltiges DMEM/F12-Medium folgender Zusammensetzung (bzgl. 10 L):

49,93 g	DMEM (GIBCO BRL, Cat.-No.: 074-01600T)
53,13 g	F12 (GIBCO BRL, Cat.-No.: 074-01700T)
24,20 g	Natriumhydrogencarbonat, wasserfrei (MERCK, Darmstadt)
33,00 g	Glucose wasserfrei (SIGMA, Deisenhofen)
2,20 g	Natriumpyruvat
2,90 g	Glutamin (2mM)
30 ml	Ethanolamin (50mM)
300 mg	Aspartat
300 mg	Asparagin
10 - 100 mg/L	Benzylpenicillin
10 - 100 mg/L	Streptomycinsulfat

Die Substanzen werden in den angegebenen Mengen auf 9,5 L mit Milliporewasser aufgefüllt, sterilfiltriert und anschließend mit 500 mL FCS (VIRALEX FCS, PAA, Cat.- No.: A15-653) versetzt.

Zur Kultivierung in T-Flaschen werden 50 mL des Nährmediums mit 200 µL der CHO-K1-Kultur unter sterilen Bedingungen in einer T-Flasche ($A = 75 \text{ cm}^2$) angeimpft und im Inkubator ($37^\circ\text{C} / 5\% \text{ CO}_2$) kultiviert. Nach 72 h werden die adhärenz gewachsenen Zellen zweimal mit sterilem CMF-PBS-Puffer gewaschen.

CMF-PBS-Puffer:

140 mM Natriumchlorid

2,7 mM Kaliumchlorid

8 mM Di-natriumhydrogenphosphat

1,5 mM Kalium-di-hydrogenphosphat

Die gewaschenen Zellen werden für 3 min mit 800 µL gebrauchsfertiger Trypsin/EDTA-Lösung (0,25%; SIGMA, Deisenhofen) bei 37°C inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wird die Lyse-Reaktion durch Zugabe von 10 mL serumhaltigem Kulturmedium gestoppt.

Zur Kultivierung im sterilen 2 L Bioreaktor (BIOSTAT) werden 2000 ml serumhaltiges Nährmedium mit 50 mL CHO-K1-Zellsuspension aus T-Flaschenkulturen angeimpft und bei 37°C , 40% Sauerstoffsättigung und pH 7,2 kultiviert.

Nach 72 Stunden enthält der Bioreaktor eine Zelldichte von $5\text{-}10 \times 10^5$ Zellen / mL, die bis auf ein Restvolumen von 50 ml entnommen und weiter aufgearbeitet werden können.

(5) Präparation der Zellen für die Elektroporation

Die aus den T-Flaschen oder dem Bioreaktor entnommenen Zellen werden für 6 min bei 90 g zentrifugiert. Das Kulturmedium wird verworfen und die pelletierten Zellen mit der gleichen Menge des isoosmolaren Elektroporationsmediums gewaschen. Die Suspension wird erneut für 10 min bei 90 g zentrifugiert und das Zellpellet in der 10-fachen Menge des Pelletvolumens mit dem Elektroporationsmedium resuspendiert. Die Anzahl der Zellen wird nach der Anfärbung mit SERVA Blau G in der „Neubauer-Kammer“ ausgezählt und für die beschriebenen Experimente mit dem Elektroporationsmedium auf folgende Zelldichten eingestellt:

Zellsuspensionen: $\rho_0 = 10^7$ Zellen / mL

Zellpellets: $\rho_0 \geq 3 \times 10^7$ Zellen / mL

Zellchargen mit mehr als 20% toten Zellen unmittelbar nach der Ernte werden verworfen. Die Experimente zur Elektroporation werden unmittelbar nach der Zellaufreinigung durchgeführt, da die Zellen nach einigen Stunden beginnen abzusterben.

(6) Zellpellets

Für die Elektroporation wird eine Zellsuspension der oben beschriebenen Zelldichte in eine Pulsküvette gefüllt und die Elektroden eingesetzt. Die gesamte Pulschammer wird für 5 min bei 90 g mit Hilfe spezieller Rotoreinsätze zentrifugiert (KONTRON HERMLE ZK 365, HERMLE Labortechnik, Wehingen). Am Boden der Küvette bildet sich das Zellpellet zwischen den Elektroden-Platten.

Für die Durchführung von Leitwertmessungen kann der verbleibende Überstand durch Einschieben eines Teflon-Stempels (vgl. Abb. II.2.) entfernt bzw. isoliert werden.

(7) Elektroporative Zellfärbung (Farbstoffmethode)

Elektropermeabilisierung

Zur Ermittlung des Anteils permeabilisierter Zellen werden diese in Gegenwart von SBG dem elektrischen Feldpuls ausgesetzt. Die Zellen werden in die Pulschammer gegeben, ggf. wie oben beschrieben pelletiert, der Leitwert bestimmt und sofort der Feldpuls appliziert. Anschließend wird die Suspension in ein Eppendorfgefäß (EPPENDORF Deutschland, Wesseling-Berzdorf) überführt und mindestens 5 min mit dem Farbstoff inkubiert. Der ungeladene Rest des Ansatzes dient als Kontrolle für die Vitalität der jeweiligen Zellpopulation.

Nach jeder Elektroporation werden die Elektroden und die Küvette mit 70 % Ethanol und anschließend mit Wasser gereinigt und anschließend getrocknet.

Transiente Permeabilisierbarkeit und Überleben

Durch das Anlegen eines elektrischen Feldpulses kann die Zelle irreversibel geschädigt werden. Zur Bestimmung des Anteils transient permeabilisierter Zellen muß somit der Anteil dieser durch den elektrischen Feldpuls getöteten Zellen ermittelt werden. Hierzu nutzt man die Tatsache, daß neben transient permeabilisierten auch tote Zellen durch SBG angefärbt werden.

Man pulst die Zellen in Abwesenheit des Farbstoffes, wobei der Leitwert durch Zugabe von KCl dem der entsprechenden Suspension mit SBG angeglichen wird.

Bei den hier beschriebenen Experimenten beträgt die KCl-Konzentration 3,75 mM. Anschließend überführt man die Suspension in ein Eppendorfgefäß und gibt nach 10 min SBG hinzu, so daß die Suspension schließlich ebenfalls 1,17 mM des Farbstoffes enthält. Nun werden die Zellen für mindestens 5 min mit SBG inkubiert. Aus der Differenz der Anzahl gefärbter Zellen N_c und der Anzahl der irreversibel geschädigten Zellen (N_{irrev}) läßt sich die Anzahl transient permeabilisierbarer Zellen in der betrachteten Probe berechnen [NEUMANN et al., 1998].

Populationsausheilkinetik

Zur Untersuchung der Ausheilkinetik der Poren werden die Zellen in dem entsprechenden Medium elektroporiert. Die Farbstoffzugabe erfolgt zu unterschiedlichen Zeiten nach Applikation des elektrischen Feldpulses. Damit werden nur die Zellen angefärbt, deren Zellmembranen zum Zeitpunkt der Farbstoffzugabe noch permeabel sind.

Auswertung der Zellfärbung

Zur Bestimmung der Anteile gefärbter Zellen, werden Einzelbilder der jeweiligen resuspendierten Zellen mit dem Lichtmikroskop (Olympus, BH-2, Hamburg) bei 100-facher Vergrößerung mit einer adaptierten Videokamera (WVP-F10E, Panasonic, Hamburg) auf ein VHS-Band aufgenommen. Nach der Beendigung der Aufnahme werden jeweils etwa 700 Zellen (gepulste Zellen und Referenz) ausgezählt und der Anteil gefärbter N_c Zellen an der Gesamtheit N_T bestimmt. Zur weiteren Auswertung wird um die Anzahl der vor der Feldpulsapplikation geschädigten Zellen N_d korrigiert und das Anfärbeverhältnis

$$f_c = \frac{N_c - N_d}{N_T - N_d} \quad (\text{III.4})$$

ermittelt.

(8) Beschichtung der Elektroden

Um die Zellen vor einem direkten Kontakt mit den Metallelektroden zu schützen, wird eine dünne Schicht ($\approx 140 \mu\text{m}$) eines Agarosegels (FLUKA, Buchs, CH) aufgebracht. Dazu werden die Edelstahlelektroden für 30 s in konzentrierter Salpetersäure und anschließend in abs. Ethanol

gereinigt. Die so präparierten Elektroden werden in eine Lösung aus 0,5% Agarose in Elektroporationsmedium von etwa 80°C getaucht. Anschließend läßt man die beschichteten Elektroden auf Raumtemperatur abkühlen.

Insbesondere zur Beschichtung von Einstichelektroden kann statt des Anätzens auch die Oberfläche mit feinkörnigem Schleifpapier angeraut werden.

Durch Eintrocknen des Gels auf der Metalloberfläche wird die mechanische Belastbarkeit erhöht.

Zur Markierung des Agarose-Gels kann dieses mit 0,01 mM Calcein (SIGMA, Deisenhofen) angefärbt werden.

(9) Messung der optischen Absorption (Absorbanz)

Die Lichtabsorption durch DNA- / RNA-Moleküle wird im Spektrometer UVIKON 943 Double Beam von Kontron Instruments, (HERMLE Labortechnik, Wehningen) gemessen, bei 20°C (293 K) im Wellenlängenbereich $180 \leq \lambda/\text{nm} \leq 400$; die Länge des Lichtweges durch die Probe beträgt 1 cm.

Vorbereitung der Proben: Etwa 15 min nach Feldpulsapplikation werden jeweils 150-200 µl einer resuspendierten Probe entnommen und für 5 min bei 90 g zentrifugiert. Der Überstand wird jeweils mit Elektroporationsmedium verdünnt und vermessen. Statt der erneuten Zentrifugation können die Zellen auch durch Filtration mittels Spritzenfiltern der Porengröße 0,2 µm (QUALILAB, MERCK, Darmstadt) abgetrennt werden.

(10) Elektroporation adhärenter Zellen

Lokale Inhomogenitäten der feldinduzierten Permeabilisierung der Zellen, z.B. aufgrund von Elektrodenrauhigkeiten werden anhand von Feldpulsapplikationen an adhären-gewachsenen CHO-Zellkulturen untersucht. Hierzu wird der obere Rand der T-Flasche (NUNC®, Wiesbaden; $A = 75 \text{ cm}^2$) abgetrennt und die Zellen zweimal mit den einzusetzenden Elektroporationsmedien gewaschen. Anschließend wird die Zell-Oligoschicht mit 10 mL 21,56 µM Propidiumiodid im jeweiligen Elektroporationsmedium überschichtet. Die Elektroden werden senkrecht auf den bewachsenen Flaschenboden gesetzt und der Feldpuls appliziert.

Nach 5 min wird der Überstand entfernt und die Fläche mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop, ZEISS, Göttingen) betrachtet.

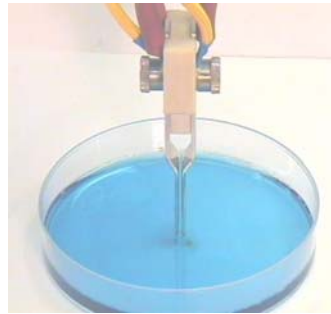


Abb. II.5: Elektrodenanordnung zur Feldpulsapplikation an adhärent gewachsene Zellschichten (im Bild wird statt der üblichen T-Flaschen eine Petrischale verwendet).

(11) Aufnahme von Impedanzspektren

Die Impedanzmessungen werden in der Elektroporationsküvette über die Elektroporations-elektroden durchgeführt, mit einem Impedance / Gain Phase Analyzer HP 4194A (HEWLETT PACKARD, Böblingen). Es wird jeweils ein Impedanzspektrum im Frequenzbereich $10 - 10^5$ kHz aufgenommen.

Die Steuerung des Meßgerätes und die Datenspeicherung erfolgen über einen PC (Software von U. Pliquet, Bielefeld). Die Datenauswertung erfolgt ebenfalls mittels einer speziellen Software (U. Pliquet) bzw. graphisch (manuell).

(12) Elektroporativer DNA-Transfer in CHO-Zellen

Zur Anzeige des elektroporativen Gentransfers wird zunächst das für das grün fluoreszierende Protein (GFP) kodierende DNA-Plasmid pEGFP-N1 (4,7 kb) in E. coli – Zellen vermehrt. Anschließend wird das Plasmid mit Hilfe eines kommerziell erworbenen Plasmidisolierungs-Kits (NUCLEOBOND PC 10000 EF, Macherey-Nagel, Düren) isoliert (Begleitheft). Die isolierte DNA wird als Stammlösung (1 mg/mL) in TE-EF – Puffer (Macherey-Nagel) aufbewahrt.

Der elektroporative DNA-Transfer in die Zellen erfolgt unter sterilen Bedingungen, um das Einschleppen von Fremdkeimen zu vermeiden. Vor und nach Feldpulsapplikation werden die Zellen 10 min mit der DNA inkubiert und anschließend in T-Flaschen umgeimpft. Nach erneuter

Kultur für 2-3 Tage bei 37°C werden die Zellen geerntet und die Anzahl fluoreszierender Zellen im Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Der Anteil durch Feldpulsapplikation irreversibel geschädigter Zellen ergibt sich durch SBG-Färbung eines Aliquots 10 min nach Feldpulsapplikation (analog dem bei der elektroporativen Zellfärbung beschriebenen Ablauf).

(13) Elektroporative Zellfusion

CHO - Fusion

Die elektroporative Fusion biologischer Zellen setzt einen engen Zell-Zell-Kontakt im Bereich der porierten Flächen bereits zum Zeitpunkt der Porenbildung voraus.

Die elektroporative Zellfusion von CHO-Zellen erfolgt während der Zentrifugation bei $\text{RCF} > 100 \text{ g}$ in einer speziell entwickelten Zentrifuge auf Basis einer Küvettenschleuder (HERDRICH GmbH, Rust). Hierbei werden konzentrische, gegeneinander isolierte Kupferringe über Kohle-Schleifkontakte mit einem Elektroporator verbunden.

Über die Kupferringe wird eine spezielle Elektrodenanordnung kontaktiert. Diese besteht aus zwei Edelstahlnetzen ($l_n = 3 \text{ mm}$), welche mittels einer Halterung aus biokompatiblen Polyacrylat in einer Polycarbonatküvette (1 x 1 cm Bodenfläche; BRANDT, Wertheim) positioniert werden. Die Ausrichtung der Netzelektroden ist dabei senkrecht zur Sedimentationsrichtung der Zellen bei Zentrifugation.

Die Anordnung ist eine Eigenkonstruktion (U. Pliquett, M. Schmeer, Bielefeld), die sich an der von ABIDOR et al. (1993, 1994) verwendeten orientiert.

Fusion von *Dictyostelium discoideum*

Bei den Schleimpilzen *Dictyostelium discoideum* erfolgt die Kontaktbildung zwischen den Zellen durch mehrstündiges Umschwenken in Phosphatpuffer, dabei bilden sich Zellaggregate aufgrund der Ausschüttung des Botenstoffes cAMP.

Als Elektrodensystem dient hier eine Bügelkammer bestehend aus zwei parallelen Platindrähten mit einem Durchmesser $d = 0,1 \text{ mm}$ und einem Abstand $l_n = 0,2 \text{ mm}$.

Die Applikation elektrischer Feldpulse erfolgt mit einem KRÜSS Fusionator Biojet CF 50 (KRÜSS GmbH, Hamburg). Durch GFP-Markierung bestimmter Zellkompartimente ist es möglich, das Verhalten während der Fusion im konfokalen Fluoreszenzmikroskop (ZEISS, Göttingen) zu beobachten.

III. ERGEBNISSE

(1) Abhängigkeit der feldpulsinduzierten Permeabilisierbarkeit von der Zelldichte

Um zu klären, ob sich Zellen hoher Packungsdichte im elektrischen Feld anders verhalten als solche in verdünnter Suspension, wird zunächst der Einfluß der Zellpackung bezüglich der feldinduzierten Permeabilisierbarkeit der CHO-Zellen untersucht. Hier zeigt sich, daß die Effizienz des elektroporativen Transmembrantransports von Ionen und Molekülen abhängig von der Packungsdichte der Zellen ist.

Eine erhöhte relative Zentrifugalbeschleunigung RCF bei der Pelletpräparation bedingt eine höhere Packungsdichte ρ . Diese hat wiederum eine Verringerung des Anteils $f_{c,total}$ durch Feldpulsapplikation in Gegenwart von SBG anfärbbarer Zellen zur Folge (Abb. III.1).

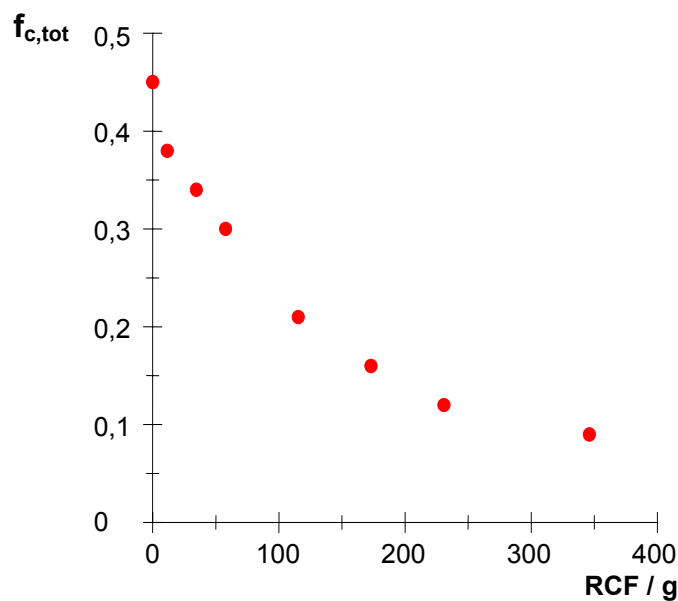


Abb. III.1: Bruchteil der in Gegenwart von 1,17 mM SERVA Blau G gefärbten Zellen (\bullet), $f_{c,total} = (N_{c,total} - N_d) / (N_T - N_d)$, nach Applikation eines Rechteckpulses der Feldstärke $E_{appl} = 1,5 \text{ kV/cm}$ und der Pulsdauer $t_E = 1 \text{ ms}$ in 290 mM Sucrose als externes Medium (Elektrodenabstand $l_n = 1 \text{ mm}$) als Funktion der Zentrifugalbeschleunigung RCF. $N_{c,total}$ gibt die Anzahl gefärbter, N_d die Anzahl vor Pulsapplikation toter und N_T die Gesamtzahl der Zellen an.

Die Präparation der Zellpellets erfolgt durch fünfminütige Zentrifugation einer dichten Zellsuspension ($\rho_0 = 3 \times 10^7$ Zellen/mL) in der Pulschammer unmittelbar vor Feldpulsapplikation.

Abb. III.2 zeigt nun die relativen Leitfähigkeitsänderungen $Y(t) = (\lambda(t) - \lambda_0) / \lambda_0 = \Delta\lambda(t) / \lambda_0$ nach Feldpulsapplikation. $\lambda(t)$ ist hier die Leitfähigkeit zum Zeitpunkt t , λ_0 die Leitfähigkeit des Systems vor Feldpulsapplikation ($t = 0$, $E_{appl} = 0$). Ebenso wie die Anfärbbarkeit nimmt die

Amplitude Y^{off} des Nachfeld-Leitfähigkeitsanstiegs mit zunehmender Zentrifugiergeschwindigkeit und damit höherer Packungsdichte ρ ab, wenn das Pulsprotokoll ansonsten unverändert bleibt. Die Nachfeld-Leitfähigkeitsänderung $Y^{\text{off}}(t)$ der Zellsuspensionen (Pellet plus Überstand) zeigt die transiente Ausheilung der Elektroporen, welche während der Feldpulsapplikation gebildet wurden. Die Leitfähigkeit vor dem Puls beträgt $\lambda_0 = 0,09$ ($\pm 0,02$) mS/m für alle Proben. Die Daten deuten darauf hin, daß die Abnahme der Amplitude Y^{off} mit höherer Packungsdichte auf die Abnahme des Elektrolytefflux durch die Membranporen in das interstitielle Medium zurückzuführen ist.

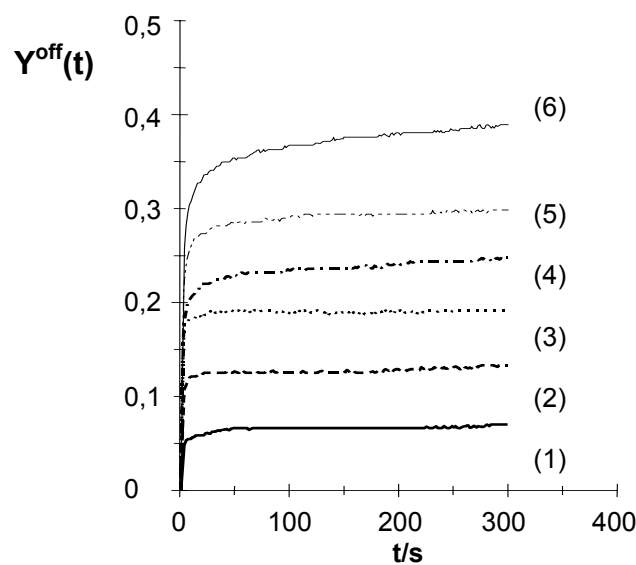


Abb. III.2: Relative Leitfähigkeitsänderungen $Y = \Delta\lambda(t) / \lambda_0$ nach Feldpulsapplikation ($E_{\text{appl}} = 1$ kV/cm, $t_E = 1$ ms) an CHO-Zell-Pellets in 290 mM Sucrose abhängig von der Zentrifugalbeschleunigung RCF; Zellsuspension (6), 4 g (5), 14 g (4), 32 g (3), 57 g (2), 90 g (1); $\lambda_0 = 0,09(\pm 0,02)$ mS/cm, $l_n = 1$ mm.

(2) Leitwertmessungen

In diesem Abschnitt werden zunächst Leitwert- bzw. Leitfähigkeitsänderungen der CHO-Zellpellets während und nach der Applikation elektrischer Feldpulse und der Einfluß der Zelldichte auf den Leitwert λ_0 vor Feldpulsapplikation untersucht, mit dem Ziel, aus den Meßdaten Rückschlüsse auf strukturelle Änderungen der Lipidmembranen zu ziehen.

(2.1) Die Leitfähigkeit von Zellpellets ist abhängig von der Packungsdichte

Man findet, daß die Grundleitfähigkeit λ_0 der Zellpellets vor Feldpulsapplikation mit zunehmendem Volumenanteil f_z der Zellen in der Probe sinkt (vgl. Abb. III.3). Daraus kann die Leitfähigkeit λ_{ex} des extrazellulären Mediums zwischen den Zellen ermittelt werden.

Handelt es sich bei der Anordnung der Zellen im Aggregat um eine kubisch-flächenzentrierte, dichte Kugelpackung mit $N_z = (1/2) \cdot 6 + (1/8) \cdot 8 = 4$ Zellen pro kubischer Elementarzelle, ergibt sich theoretisch eine maximale Volumenfraktion $f_z = 0,74$.

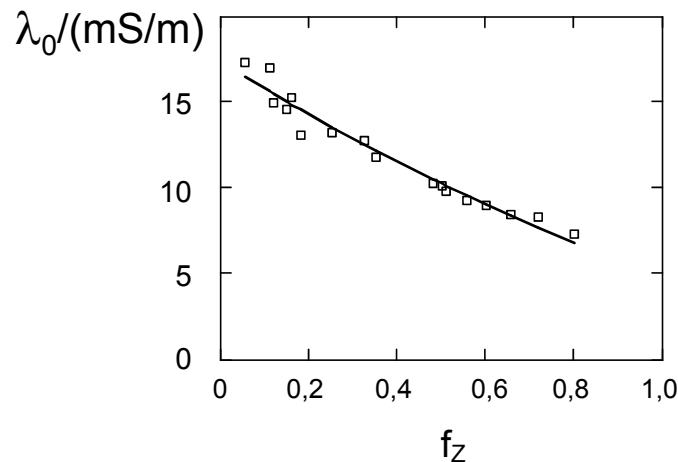


Abb. III.3: Die Leitfähigkeit λ_0 einer CHO-Zell-Suspension bzw. eines Pellets in 290 mM Sucrose (ohne Applikation elektrischer Feldpulse) als Funktion des Volumenanteils f_z der Zellen.

Die im weiteren standardmäßig verwendete Packungsdichte der CHO-Zellen entspricht einer Volumenfraktion $f_z = 0,6$ und liegt damit unterhalb der maximalen Packungsdichte. Damit ergibt sich ein mittlerer Zell-Zell-Abstand $L - 2\bar{a}_c = 1 \mu\text{m}$. $L = 16 \mu\text{m}$ ist hier der mittlere Abstand der Zellmittelpunkte, $\bar{a}_c = 7,5 \mu\text{m}$ der mittlere Zellradius.

(2.2) Größenverteilung der CHO-Zellen

Aufgrund unterschiedlicher Wachstumsstadien variiert der Zellradius suspendierter Zellen innerhalb einer Population um den oben genannten Mittelwert $\bar{a}_c = 7,5 \mu\text{m}$. Die mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops und einer entsprechenden Skalierung gemessene Radienverteilung der CHO-Zellen ist in Abb. III.4 dargestellt. Die Größenverteilung folgt einer Normalverteilung, wobei in der Abbildung $P(a_c) = n_a / N$ der Anteil der n_a Zellen mit einem bestimmten

Radius a_c innerhalb einer Stichprobe von N Zellen ist. Es ergibt sich eine Standardabweichung des Zellradius von $\sigma = 0,7 \mu\text{m}$.

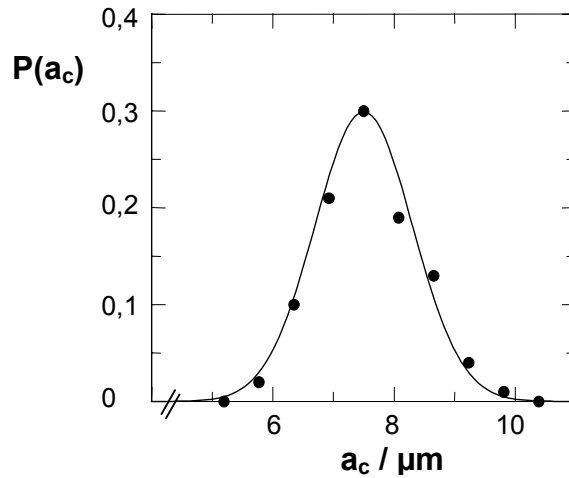


Abb. III.4: Größenverteilung suspendierter CHO-Zellen; $P(a_c) = n_a / N$ ist der Anteil der n_a Zellen mit einem bestimmten Radius a_c innerhalb einer Stichprobe von N Zellen. Die Größenverteilung folgt einer Normalverteilung $P(a_c) = 1/(2\pi)^{1/2} \exp[-(a_c - \bar{a}_c)^2/(2\sigma^2)]$ mit dem mittleren Zellradius $\bar{a}_c = 7,5 \pm 0,7 \mu\text{m}$.

(2.3) Leitwertänderungen während und nach Feldpulsapplikation

Wie in Abb. III.5 gezeigt, treten bei Zellen hoher Packungsdichte in hochohmiger Umgebung (290 mM Sucrose) Leitfähigkeitsänderungen sowohl im Ein- ($Y(t)$) als auch im Nach-Feld-Bereich ($Y^{\text{off}}(t)$) auf, wobei die Amplituden der jeweiligen Signale mit zunehmender Feldstärke ansteigen.

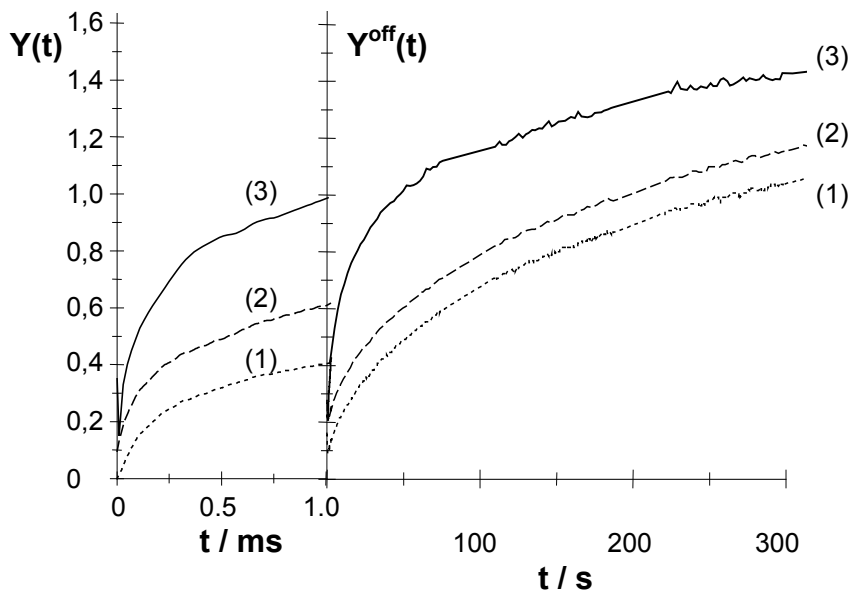


Abb. III.5: Relative Leitfähigkeitsänderungen $Y(t) = \Delta\lambda/\lambda_0$ während und nach Applikation ($Y^{\text{off}}(t)$) eines Feldpulses der Feldstärke $E_{\text{appl}} = 0,75 \text{ kV/cm}$ (1, \cdots), $1,0 \text{ kV/cm}$ (2, $--$) und $1,5 \text{ kV/cm}$ (3, $-$), ($l = 2 \text{ mm}$) und der Pulsdauer $t_E = 1,0 \text{ ms}$ an ein CHO-Zellpellet in 290 mM Sucrose mit der Anfangsleitfähigkeit $\lambda_0 = 0,09 \text{ mS/cm}$ ($T = 293 \text{ K}$).

Die Abweichungen zu Abb. III.2 ergeben sich aus der Verwendung einer anderen Zellcharge.

Die Einfeld-Leitfähigkeitsänderungen $Y(t)$ zeigen mehrere kinetische Moden. Die Kurven (2) und (3) in Abb. III.5 weisen einen sehr schnellen, nicht zeitlich aufgelösten Leitfähigkeitsanstieg, gefolgt von mindestens zwei weiteren, kinetisch unterschiedlichen Beiträgen auf. Der schnelle Anteil wird erst bei Feldstärken $E_{\text{appl}} \geq 0,8 \text{ kV/cm}$ sichtbar. Der Vergleich mit Leitfähigkeitsdaten bei der Elektroporation salzgefüllter Vesikel [GRIESE et al., 2002] legt nahe, daß die schnelle Phase auf Zelloberflächen-Effekte zurückzuführen ist, während die beiden langsameren Relaxationen die feldinduzierte Porenbildung widerspiegeln und sich in ihrer Kinetik deutlich unterscheiden.

Die Leitfähigkeiten am Ende der Einfeldphase ($t_E = 1 \text{ ms}$) sind höher als die Anfangswerte der Ausfeldphase, d.h. unmittelbar nach Abschalten des elektrischen Feldes fällt die Leitfähigkeit innerhalb von Millisekunden teilweise ab und steigt anschließend aufgrund des Ausflusses von intrazellulärem Elektrolyt durch ausheilende Membranporen weiter an. Diese Interpretation ist konsistent mit den Daten einer Sequenz von Feldpulsen. Die Leitfähigkeitsänderung im Ein-Feld weist auch beim zweiten und dritten applizierten Feldpuls einen reversiblen Anteil auf, korreliert mit dem Öffnen und Schließen bestimmter Porenzustände. Die Leitfähigkeitsänderungen im Nach-Feld spiegeln den Elektrolytaustritt aus den ausheilenden Zellen in das interstitielle Medium wider, die Bildung von Membranporen im elektrischen Feld ist also zumindest teilweise reversibel.

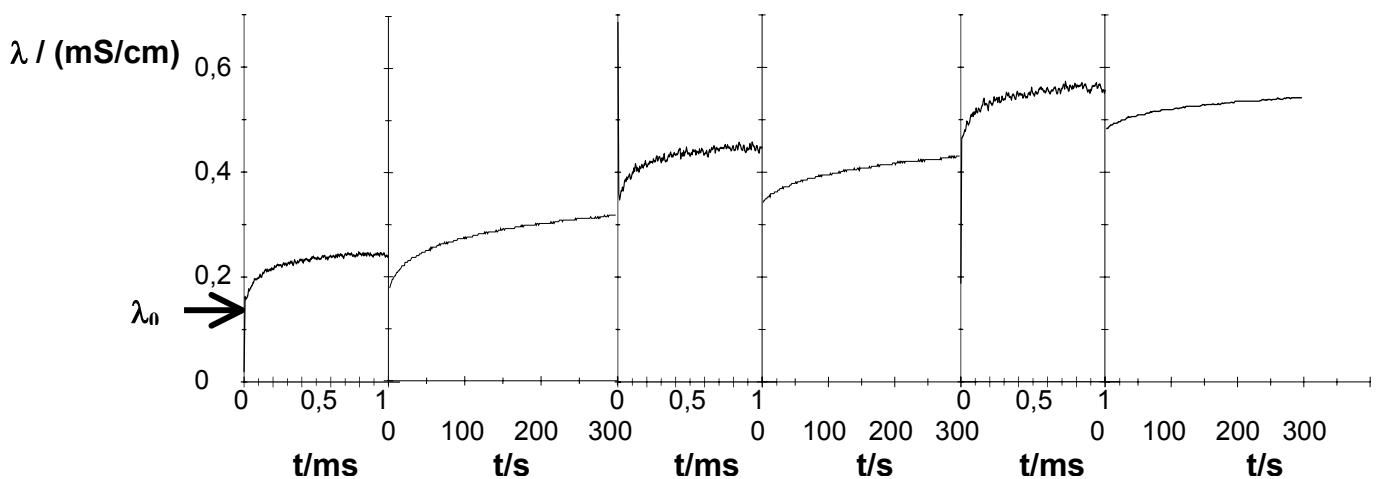


Abb. III.6: Leitfähigkeitsänderungen während und jeweils 5 min nach Feldpulsapplikation der Feldstärke $E_{\text{appl}} = 1,0 \text{ kV/cm}$ und der Pulsdauer $t_E = 1 \text{ ms}$ an CHO-Pellets in 290 mM Sucrose als Funktion der Zeit; $\lambda_0 = 0,13 \text{ mS/cm}$ bei 293 K (Pfeil), Elektrodenabstand $l_n = 1 \text{ mm}$.

(2.4) Einfluß der Medienzusammensetzung auf Leitfähigkeitsänderungen im Ein- und Ausfeld

Das Leitfähigkeitsverhalten der Zellpellets variiert allerdings mit der Zusammensetzung des extrazellulären Mediums: Bei Erhöhung der Elektrolytkonzentration im Elektroporationsmedium unter Beibehaltung isoosmotischer Bedingungen nimmt die relative Leitfähigkeitsänderung Y im Einfeld-Bereich ab, wobei die oben beschriebenen drei kinetischen Phasen auch hier erkennbar bleiben. Die zugrundeliegenden Prozesse sind also unabhängig von der Umgebung.

Im Ausfeld-Bereich nehmen die Amplituden der relativen Leitfähigkeitsänderungen ausgehend von 290 mM Sucrose bis zu einem NaCl-Anteil unter 100 mM ebenfalls mit zunehmender Salzkonzentration ab. Bei weiterer Erhöhung des Elektrolytanteils im Elektroporationsmedium werden die Leitfähigkeitsänderungen im Nachfeld-Bereich negativ. Neben der Erhöhung der Elektrolytkonzentration durch Austritt intrazellulären Mediums zeigen die Daten weitere Prozesse an.

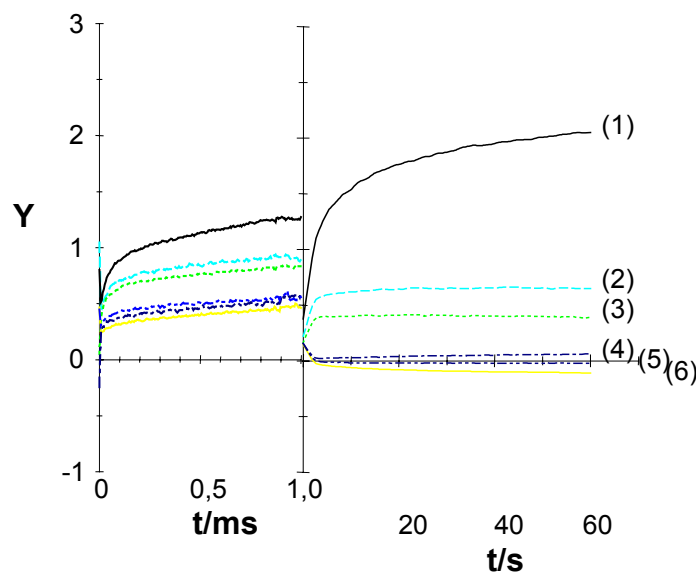


Abb. III.7: Relative Leitfähigkeitsänderungen $Y = \Delta\lambda/\lambda_0$ während und nach Feldpulsapplikation ($E_{\text{appl}} = 1,5$ kV/cm, $t_E = 1$ ms, $l_n = 2$ mm) an CHO-Zell-Pellets in Medien unterschiedlicher Zusammensetzung:

(1) 0 mM PBS / 290 mM Sucrose; (2) 7,1 mM PBS / 276 mM Sucrose; (3) 13,6 mM PBS / 263 mM Sucrose; (4) 75,0 mM PBS / 145 mM Sucrose; (5) 100,0 mM PBS / 96,7 mM Sucrose; (6) 150 mM PBS / 0 mM Sucrose.

(2.5) Temperaturabhängigkeiten der Poren-Bildung

Da die Kinetik unterschiedliche Membranprozesse anzeigt, sollten die zugrundeliegenden Strukturänderungen der Membran temperaturabhängig sein.

Die Amplituden der Leitfähigkeitsänderungen während und nach Feldpulsapplikation steigen bei unverändertem Pulsprotokoll mit zunehmender Temperatur an. Die Kinetiken von Porenbildung (Leitfähigkeitsrelaxationen während der Feldpulsapplikation) und –Ausheilung (Nachfeld-Relaxation) sind ebenfalls temperaturabhängig. Zudem werden die Prozesse mit steigender Temperatur schneller.

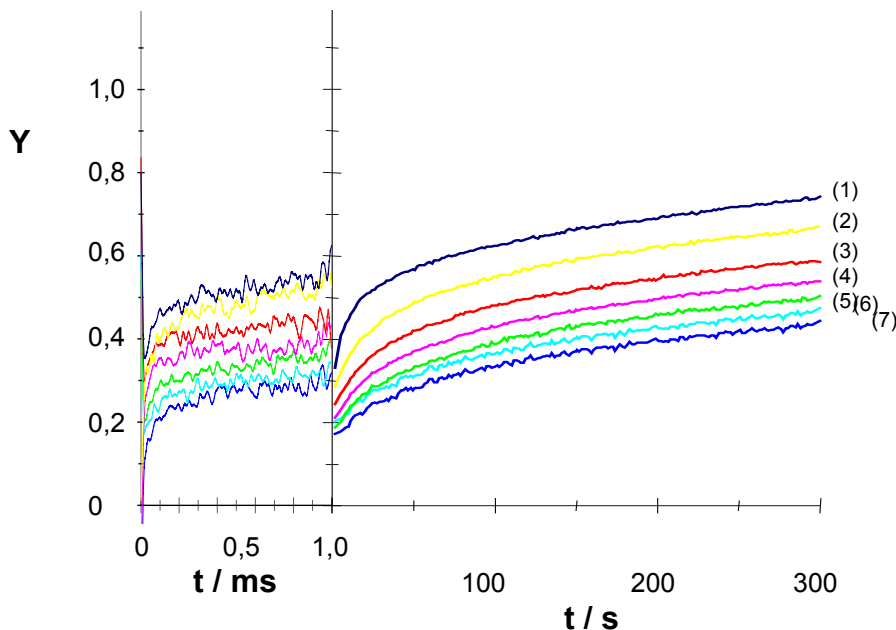


Abb. III.8: Relative Leitfähigkeitsänderungen $Y = \Delta\lambda/\lambda_0$ während und nach Applikation einzelner Feldpulse der Feldstärke $E_{\text{appl}} = 1,5 \text{ kV/cm}$ ($l_n = 1 \text{ mm}$) und der Pulsdauer $t_E = 1,0 \text{ ms}$ an CHO-Zellpellets in 290 mM Sucrose bei unterschiedlichen Temperaturen;

- 5°C (7), - 10°C (6), - 15°C (5), - 20°C (4), - 25°C (3), - 30 °C (2), - 34 °C (1).

An dieser Stelle sei noch erwähnt, daß durch entsprechende Referenzmessungen sichergestellt wurde, daß Temperaturerhöhungen durch Joulesche Erwärmung während des Feldpulses nicht in die gemessenen Kurven einfließen.

(3) Impedanzspektren vor und nach Feldpulsapplikation

Strukturelle Veränderungen des Zellsystems, hervorgerufen durch die elektrischen Feldpulse lassen sich auch anhand der Impedanzspektren der Zellpellets vor und nach Feldpulsapplikation verfolgen.

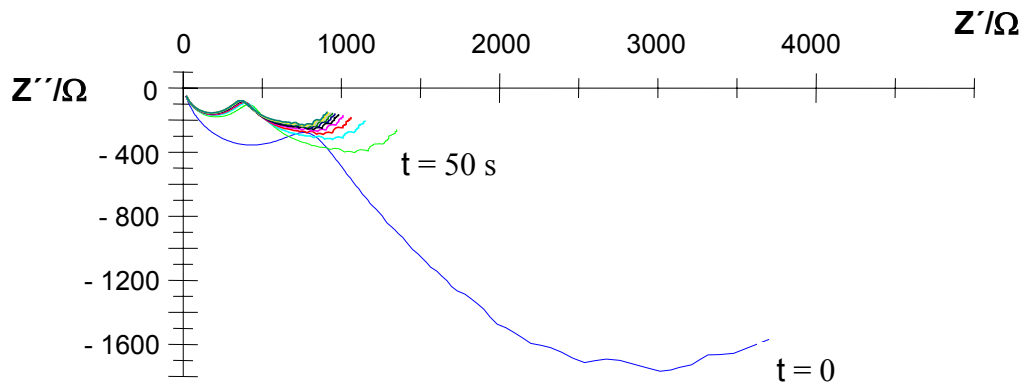


Abb. III.9: Impedanzspektren eines CHO-Pellets in 290 mM Sucrose vor (-) bzw. 50 s (-), 110 s (-), ..., 590 s (-) nach Applikation eines elektrischen Feldpulses der Feldstärke $E_{\text{appl}} = 1,0 \text{ kV/cm}$ und der Pulsdauer $t_E = 1 \text{ ms}$.

Nach Feldpulsapplikation sind deutliche Verringerungen sowohl des Realteils Z' als auch des Imaginärteils Z'' zu erkennen. Diese sind neben dem Austritt von Elektrolyt aus dem Zellinneren in das interstitielle Medium auch auf strukturelle Änderungen der Zellmembranen wie die im elektrischen Feld gebildeten Membranporen aber auch auf irreversibel geschädigtes Zellmaterial zurückzuführen.

(4) Elektroporative Zellfärbung

Kinetische Betrachtungen bezüglich der feldinduzierten Bildung und Ausheilung von Membranporen sind auch anhand der elektroporativen Zellfärbung möglich.

(4.1) Pulsdauerabhängigkeit der elektroporativen Zellfärbung

Nachdem bei den bisherigen Untersuchungen Rechteckpulse der Pulsdauer $t_E = 1 \text{ ms}$ bei variabler Feldstärke E_{appl} verwendet wurden, soll nun der Einfluß der Pulsdauer betrachtet werden, zumal offensichtlich gerade kinetische Untersuchungen Aufschluß über strukturelle Membranprozesse geben können.

Der Leitfähigkeitsanstieg Υ im Einfeld nimmt mit zunehmender Pulsdauer bei gegebener Feldstärke zu (vgl. Abb. III.5). Bei Verkürzung der Pulsdauer bedarf es einer höheren Feldstärke, um den gleichen Effekt zu erzielen.

Konsistent mit der Beobachtung bei der Pulsdauerabhängigkeit der Leitfähigkeitsdaten ist die Pulsdauerabhängigkeit der Anfärbbarkeit der Zellen. Abbildung III.10 zeigt, daß der Anteil $f_{c,\text{total}}$ der gefärbten Zellen mit steigender Pulsdauer t_E bei gegebener externer Feldstärke zunimmt.

Liegt die applizierte Feldstärke oberhalb des scheinbaren Schwellenwertes E_{th} , bei dem im betrachteten Zeitbereich Elektroporation auftritt, ist mit zunehmender Pulsdauer ein stetiger Anstieg des Anteils elektroporativ anfärbarer Zellen zu beobachten.

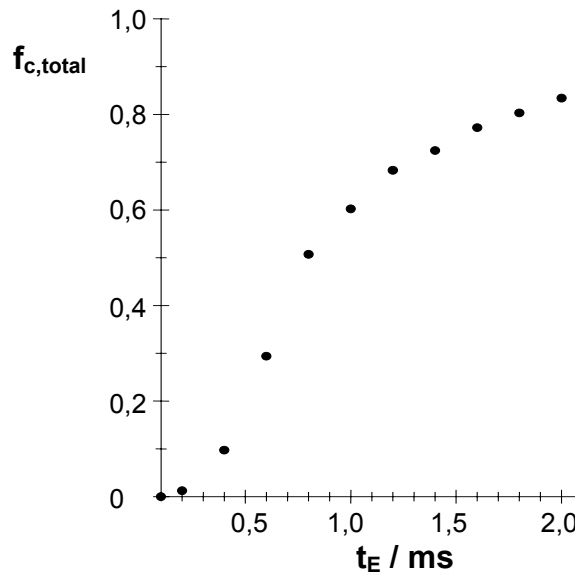


Abb. III.10: Anteile $f_{c,\text{total}}$ gefärbter Zellen nach Feldpulsapplikation in Gegenwart von 1,17 mM SBG abhängig von der Pulsdauer t_E bei einer externen Feldstärke von $E_{\text{appl}} = 1,5 \text{ kV/cm}$.

Elektroporationsmedium: 290 mM Sucrose; $l_n = 1 \text{ mm}$; $T = 293 \text{ K}$ (20°C).

(4.2) Nachfeld - Porenausheilung und Zellfärbung

Die langsame Ausheilung der elektroporierten CHO-Zellen wird neben den Leitfähigkeitsrelaxationen auch durch Färbung der Zellen nach Zugabe des Farbstoffs SERVA Blau G zu verschiedenen Zeiten nach Applikation eines Rechteckpulses angezeigt. Abb. III.11 zeigt die Abnahme des Anteils $f_{c,\text{total}}$ der anfärbbaren Zellen mit zunehmendem Zeitintervall t_{add} zwischen Feldpulsapplikation und Farbstoffzugabe.

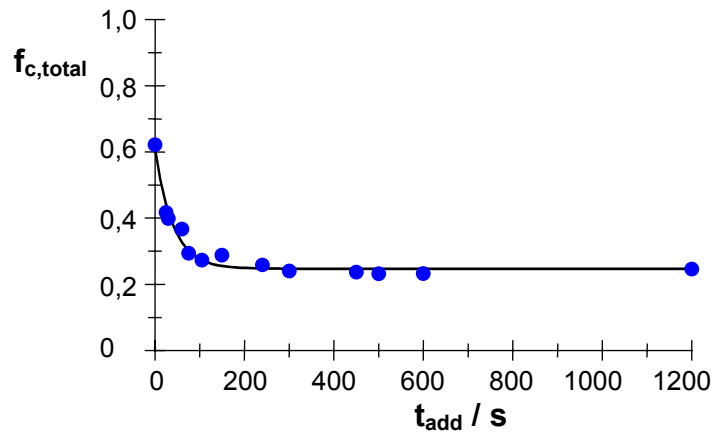


Abb. III.11: Bruchteile gefärbter Zellen abhängig vom Zeitpunkt t_{add} der Farbstoffzugabe nach Applikation eines Feldpulses der Feldstärke $E_{\text{appl}} = 2,0 \text{ kV/cm}$ und der Pulsdauer $t_E = 1 \text{ ms}$; Elektrodenabstand $l_n = 2 \text{ mm}$.

(5) Austritt von Polynucleotiden aus den Zellen

Anhand der typischen optischen Absorption bei $\lambda = 260$ nm läßt sich mit steigender Feldstärke ein zunehmender Anteil von Polynucleotiden im extrazellulären Medium nachweisen. Das bedeutet, daß neben kleinen Ionen auch Makromoleküle zumindest aus einem Teil der elektroporierten Zellen austreten.

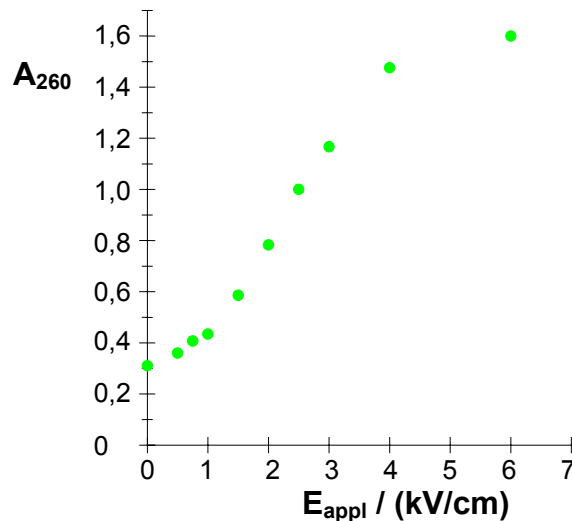


Abb. III.12: Absorbanz (A_{260}) von Polynucleotiden (DNA, RNA) bei $\lambda = 260$ nm im interstitiellen Medium, 10 min nach Feldpulsapplikation ($t_E = 1$ ms, $l_n = 1$ mm) an CHO-Zellpellets in 290 mM Sucrose abhängig von der applizierten Feldstärke. Die Messung erfolgt nach Verdünnung auf das dreißigfache Volumen und Entfernen des Zellmaterials durch Zentrifugation.

(6) Elektrodeneffekte

Da ein beträchtlicher Anteil der Zellen unmittelbaren Kontakt zu den Elektroden hat, ist die Oberflächenrauigkeit der Elektroden zu berücksichtigen.

(6.1) Elektroporative Zellfärbung

Bei Feldpulsapplikation gleichbleibender Pulsdauer t_E und steigender Feldstärke E an Zellpellets erhält man einen ansteigenden Anteil $f_{c,\text{total}}$ insgesamt gefärbter Zellen. Insbesondere bei Zellpellets wird aber gleichzeitig ein beträchtlicher Anteil $f_{c,\text{irrev}}$ der Zellen irreversibel geschädigt, auch diese werden angefärbt. Das hat zur Folge, daß der Anteil der Zellen $f_{c,\text{trans}} = f_{c,\text{total}} - f_{c,\text{irrev}}$, die transient permeabilisiert werden, d.h. feldinduziert Membranporen bilden, welche ohne Schädigung der Zelle wieder ausheilen, sehr gering ist (vgl. Abb. III.13 a).

Versieht man die Elektrodenoberflächen mit einem dünnen (ca. 0,14 mm) Agarosegel, verringert sich der Anteil irreversibel geschädigter Zellen $f_{c,irrev}$. Da die Beschichtung auf den Anteil insgesamt gefärbter Zellen $f_{c,total}$ keinen wesentlichen Einfluß hat, erreicht man auf diese Weise eine signifikante Erhöhung des Anteils transient permeabilisierter Zellen $f_{c,trans}$ (Abb. III.13 b) [NEUMANN et al., Gebrauchsmuster, 2003]. Die Zellen werden also durch die Beschichtung vor schädigenden Elektrodeneffekten geschützt.

Eine Vergrößerung des Elektrodenabstandes hat im wesentlichen den gleichen Effekt, so daß die Kombination aus – im Rahmen der Möglichkeiten - großem Elektrodenabstand l_n und Beschichtung der Elektrodenoberflächen das optimale Ergebnis bzgl. transients Permeabilisierung liefert.

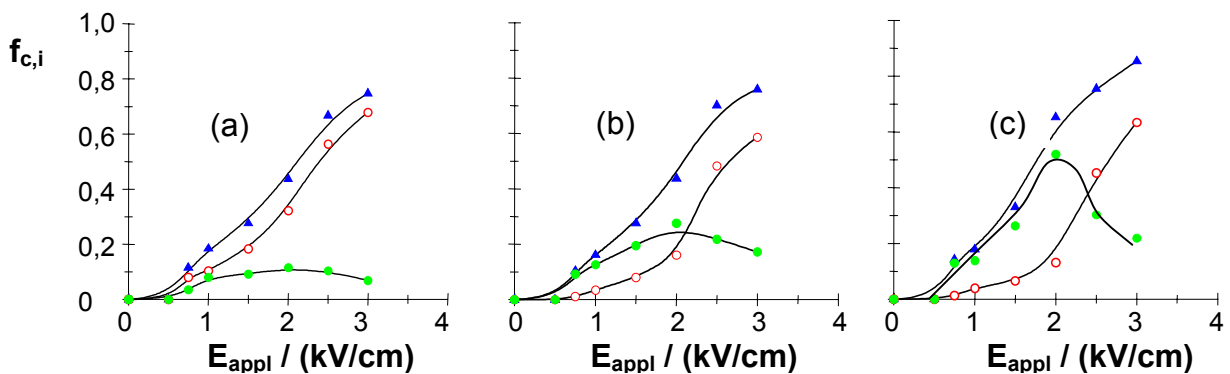


Abb. III.13: Anteile $f_{c,i} = (N_i - N_d)/(N_T - N_d)$ SBG-gefärbter CHO-Zellen nach Feldpulsapplikation der Pulsdauer $t_E = 1$ ms, wobei N_i die Anzahl gefärbter, N_d die Anzahl vor Pulsapplikation toter und N_T die Gesamtzahl der Zellen angeben. $f_{c,total}$ (▲) gibt den Bruchteil insgesamt gefärbter, $f_{c,irrev}$ (○) den Bruchteil irreversibel geschädigter (Farbstoffzugabe 30 min nach Feldpuls) und $f_{c,trans} = f_{c,total} - f_{c,irrev}$ (●) den Bruchteil transient permeabilisierter Zellen wieder; (a) Edelstahl-Plattenelektroden, $l_n = 1$ mm; (b) Agarose beschichtete Edelstahl-Plattenelektroden, $l_n = 1$ mm, (c) Agarose beschichtete Edelstahl-Plattenelektroden, $l_n = 2$ mm.

Entnimmt man nach Feldpulsapplikation Anteile des Zellpellets von den Elektrodenoberflächen und aus der Pelletmitte, zeigt sich, daß die Zellen von den Elektrodenoberflächen schon bei geringen applizierten Feldstärken gefärbt sind. Der Anteil gefärbter Zellen in der Pelletmitte hingegen steigt mit zunehmender Feldstärke an (Abb. III.14). Aus zusätzlichen Untersuchungen (Farbstoffzugabe nach Porenausheilung) ist ersichtlich, daß die von den Elektrodenoberflächen entnommenen Zellen bis auf wenige Prozent irreversibel geschädigt sind. Damit ist gezeigt, daß die Zellschädigung tatsächlich hauptsächlich mit Elektrodeneffekten zusammenhängt.

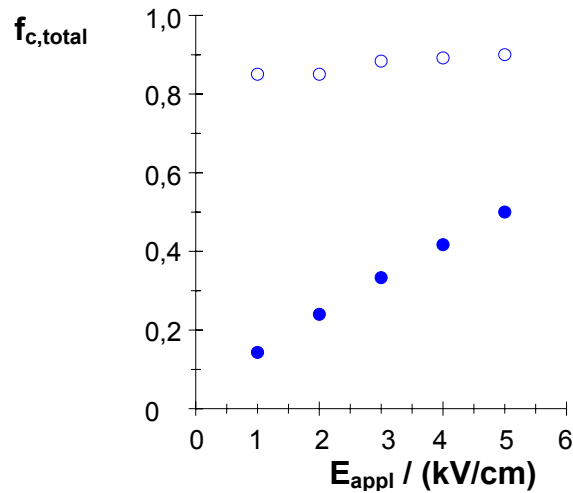


Abb. III.14: Bruchteile gefärbter CHO-Zellen $f_{\text{c,total}}$, entnommen von den Elektrodenoberflächen (\circ) und aus der Pelletmitte (\bullet) nach Feldpulsapplikation $t_E = 0,75$ ms mit Edelstahl-Plattenelektroden, $l_n = 1$ mm. Der Anteil transient permeabilisierter Zellen an den Elektroden beträgt lediglich etwa 2 %, die anderen sind irreversibel geschädigt.

Eine weitere Möglichkeit zur zweidimensionalen räumlichen Auflösung permeabilisierter Bereiche ist die Feldpulsapplikation an adhären auf einer Oberfläche gewachsene Zellschichten. Die beschriebenen Effekte eines verstärkten Auftretens permeabilisierter (hier angefärbter) Zellen in Elektrodennähe sind hier ebenfalls deutlich erkennbar, wie in Abb. III.15 gezeigt ist.

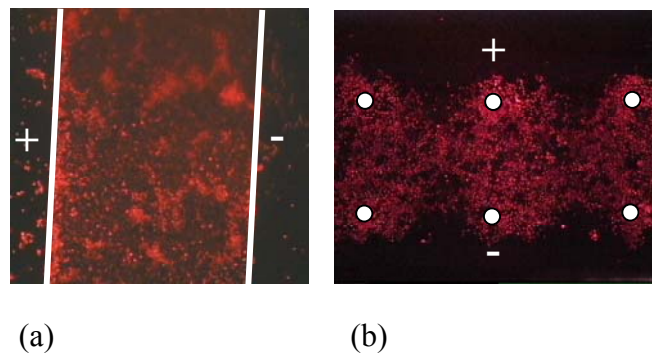


Abb. III.15: Adhärente CHO-Oligoschicht mit einem Überstand von 22 μM Propidiumiodid in 290 mM Sucrose nach Feldpulsapplikation mittels aufgesetzter Parallelplatten-Elektroden mit einem Elektrodenabstand $l_n = 1$ mm; $E_{\text{appl}} = 1,5$ kV/cm, $t_E = 1$ ms (a) und mit Nadelelektroden, $l_n = 1,5$ mm (b).

(6.2) Elektrodeneffekte bei Leitfähigkeitsmessungen

Die Verwendung eines Vier-Elektroden-Systems mit zwei Puls- und zwei Messelektroden [PLIQUETT et al., 2002] ermöglicht einen Vergleich der Leitfähigkeitsänderungen bei

Feldpulsapplikation mit und ohne Agarose-Beschichtung der Pulselektroden. Damit läßt sich untersuchen, ob die gefundenen Elektrodeneffekte in die Einfeld-Leitfähigkeitsmoden eingehen. Die Leitfähigkeitsänderungen während der Feldpulsapplikation zeigen keinen signifikanten Unterschied für beschichtete und unbeschichtete (Puls-) Elektroden. Die irreversible Zellschädigung ist demnach aus den Einfeld-Leitfähigkeitsdaten nicht ersichtlich. Das bedeutet, daß die Zellen erst später, nach Abschalten des elektrischen Feldes absterben, dieser Prozeß also nicht in die während Feldpulsapplikation aufgenommenen Leitfähigkeitsdaten einfließt.

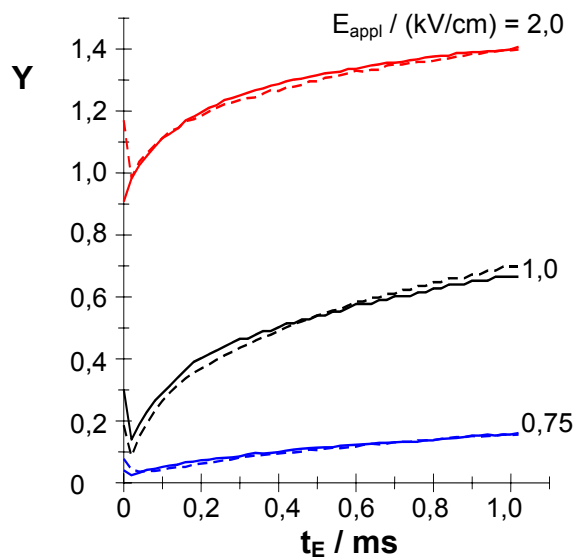


Abb. III.16: Relative Leitfähigkeitsänderungen $Y = \Delta\lambda/\lambda_0$ zwischen den inneren Meßelektroden ($l_{\text{in}} = 1$ mm) während Feldpulsapplikation an CHO-Pellets in 290 mM Sucrose mit (-) und ohne (--) Agarosebeschichtung der äußeren Elektroden ($l_{\text{n}} = 2$ mm); $E_{\text{appl}} = 0,75$ kV/cm (-), 1,0 kV/cm (-), 2,0 kV/cm (-).

Die Verwendung des beschriebenen Vier-Elektroden-Systems ermöglicht weiterhin eine Korrelation zwischen am Gerät eingestellter ($E_{\text{appl}} = U_{\text{appl}} / l_{\text{n}}$) und tatsächlich an den äußeren Pulselektroden ($E_{\text{meas}} = E_{\text{nom}} = U_{\text{nom}} / l_{\text{n}}$) und den inneren Meßelektroden ($E_{\text{meas}} = E_{\text{in}} = U'_{\text{in}} / l'_{\text{in}}$) anliegender Feldstärke. In Abb. III.17 wird deutlich sichtbar, daß die Feldstärke im Bereich der Pelletmitte (innere Elektroden) deutlich unter der zwischen den äußeren Elektroden liegt, damit sollte die Feldpulsapplikation bei Zellen in der Nähe der Elektroden einen größeren Effekt erzielen als in der Pelletmitte.

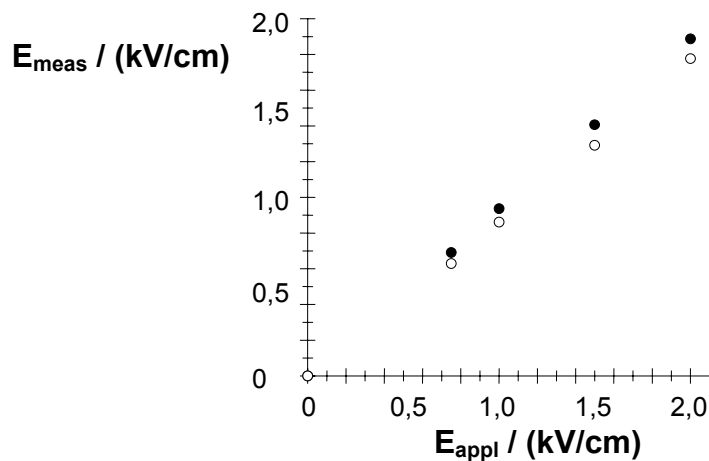


Abb. III.17: Aus der gemessenen Spannung und den Elektrodenabständen ermittelte Feldstärke E_{meas} zwischen den äußeren ($E_{meas} = E_{nom}$, ●) und den inneren Elektroden ($E_{meas} = E_{in}$, ○) während Feldpulsapplikation an CHO-Pellets in 290 mM Sucrose in Abhängigkeit von der applizierten Feldstärke E_{appl} ; Abstand der äußeren Elektroden zur Feldpulsapplikation $l_n = 2$ mm, Abstand der inneren Meß-Elektroden $l_{in} = 1$ mm.

(6.3) Agarosebeschichtung der Nadel-Einstichelektroden

Die im Rahmen der Untersuchung von Elektrodeneffekten auf die Elektroporation dicht gepackter Zellen entwickelte Elektrodenbeschichtung mit Agarose zur Minimierung schädigender Elektrodeneffekte hat auch ein Anwendungspotential bei Einstichelektroden zur Elektroporation von Gewebe. Deshalb ist die Verwendbarkeit einer solchen Beschichtung bei Einstech-Elektrodensystemen zu testen.

Die Anwendbarkeit solcher agarosebeschichteter Nadelelektroden bei Gewebe wird anhand von Einstichexperimenten an frischem Schlachtmaterial untersucht. Die Beladung des Gels mit einem makromolekularen Farbstoff, hier Calcein ($z = -4$) zeigt dessen Verbleib nach Entfernen der Nadel an.

Um die Agarosebeschichtung nicht bereits beim Einstich abzustreifen, wird diese auf der Nadeloberfläche getrocknet. Das Aufquellen erfolgt dann durch die Einwirkung der Gewebsflüssigkeit nach dem Einstich innerhalb weniger Sekunden.

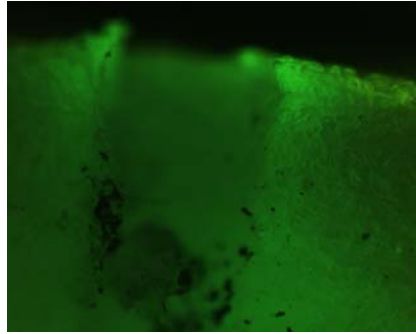


Abb. III.18: Fluoreszenzaufnahme eines Schnittes durch ein Schweineohr parallel zur Einstich-richtung einer mit Agarose beschichteten Kanüle ($\varnothing = 1,2 \text{ mm}$). Das Agarosegel wurde mit Calcein angefärbt und auf der Nadeloberfläche getrocknet, die Verweildauer der Kanüle im Gewebe betrug 60 s.

Die Abbildung III.18 zeigt, daß die Beschichtung mitsamt dem Farbstoff zusammen mit der Nadel in das Gewebe eindringt, zumal es sich bei dem verwendeten knorpeligen Gewebe um ein vergleichsweise festes Material handelt. Weiterhin ist die Diffusion des verwendeten wasserlöslichen Farbstoffes Calcein in das umgebende Gewebe zu erkennen.

Beim Herausziehen der Nadel verbleibt das Agarosegel im Stichkanal.

(7) Elektroporativer DNA-Transfer in CHO-Zellen

(7.1) Probenpräparation

Beim elektroporativen DNA-Transfer in CHO-Zellen ergibt sich kein Transfektionserfolg, wenn man die DNA-Lösung auf das Pellet gibt. Wird die DNA jedoch zusammen mit den Zellen suspendiert und aus dieser gemischten Suspension das Pellet durch Zentrifugation hergestellt, wird bei Wahl der richtigen Feldpulsparameter ein Teil der Zellen transfiziert.

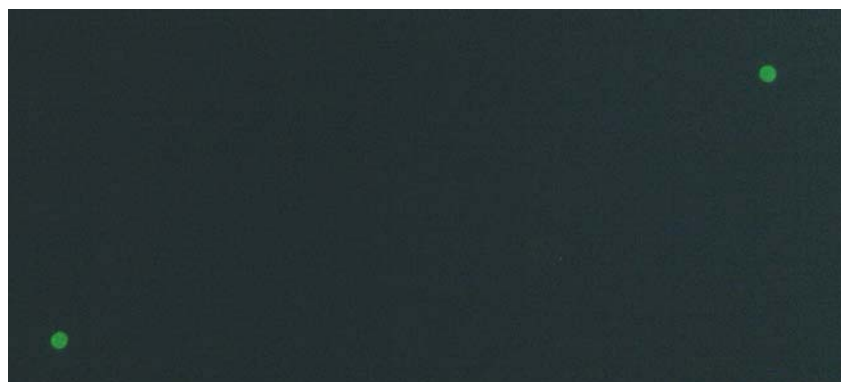


Abb. III.19: Grün fluoreszierende CHO-Zellen 48 h nach elektroporativem Transfer von GFP-DNA; fluoreszenzmikroskopische Aufnahme mit 160-facher Vergrößerung (Zellradius $7,5 \text{ }\mu\text{m}$).

(7.2) Auswahl der optimalen Pulsparameter

Zum elektroporativen DNA-Transfer können elektrische Feldpulse mit zwei unterschiedlichen Anteilen verwendet werden. Ein kurzer Hochspannungsbereich (HV) dient der Bildung von Membranporen, der sich unmittelbar anschließende Bereich niedrigerer Spannung (LV) dem Transfer der DNA in die Zellen (SUKHAREV et al., 1992).

Aus der unabhängigen Variation der Feldstärken der HV- und LV-Bereiche ergibt sich das für die gegebenen Pulsdauern optimale Feldstärkeprofil.

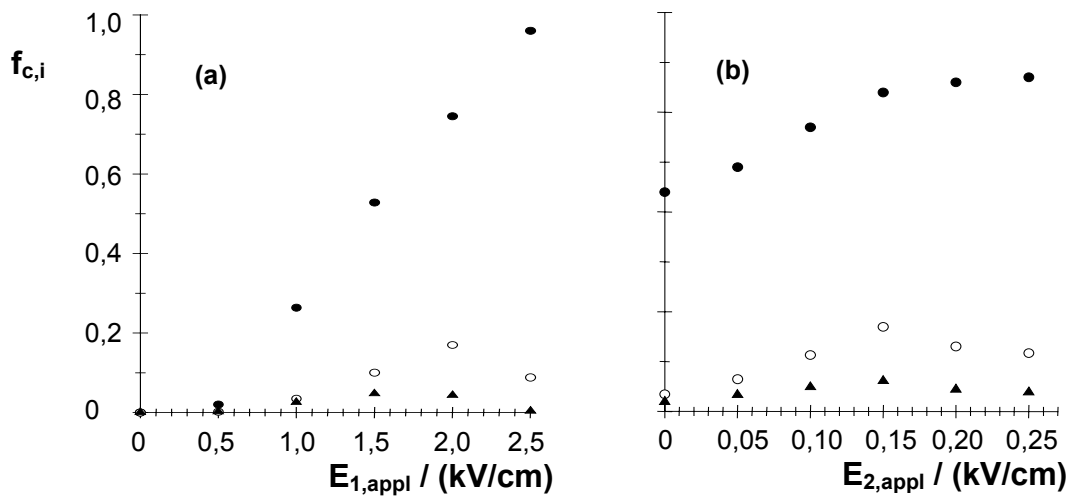


Abb. III.20: Anteile durch GFP-Produktion grün fluoreszierender Zellen $f_{c,GFP}$ (O) in der Kultur 48 h nach Feldpulsapplikation, durch Feldpulsapplikation irreversibel geschädigter Zellen $f_{c,irrev}$ (●) und Anteile durch GFP-Produktion grün fluoreszierender Zellen f_{GFP} 48 h nach Feldpulsapplikation, bezogen auf die Gesamtheit der Zellen N_T vor Feldpulsapplikation (▲).

(a) HV-Puls variabler Feldstärke (s.o.) mit $t_E = 0,5$ ms, LV-Puls mit $E_{2,appl} = 0,15$ kV/cm und $t_E = 10$ ms.

(b) HV-Puls mit $E_{1,appl} = 2,0$ kV/cm und $t_E = 0,5$ ms, LV-Puls variabler Feldstärke (s.o.) mit $t_E = 10$ ms.

Verwendung steriler Einmal-Elektroporationsküvetten mit Aluminiumelektroden ($l = 4$ mm).

300 μ L einer Zellsuspension von 1×10^8 Zellen/mL in 290 mM Sucrose, 3,75 mM KCl werden mit 15 μ L DNA-Lösung (1 mg/mL) versetzt, 5 min inkubiert, durch 5-minütige Zentrifugation bei 90 g das Pellet gebildet und vor Feldpulsapplikation der Überstand entfernt.

Mit steigender Feldstärke ist ein erhöhter Anteil irreversibel geschädigter Zellen zu erkennen, gleichzeitig steigt der Anteil der transfizierten Zellen bis $E_{1,appl} = 2,0$ kV/cm bzw. $E_{2,appl} = 0,15$ kV/cm für die verwendeten Pulsprotokolle stetig an. Bei höheren Feldstärken überwiegen die schädigenden Effekte.

(7.3) Ermittlung der einzusetzenden DNA-Konzentration

Anhand der oben erhaltenen Pulsparameter ($E_{1,appl} = 2,0 \text{ kV/cm}$, $t_{E1} = 0,5 \text{ ms}$; $E_{2,appl} = 0,15 \text{ kV/cm}$, $t_{E2} = 10 \text{ ms}$) wird die einzusetzende DNA-Konzentration durch Elektroporation nach Zugabe unterschiedlicher Volumina der DNA-Stammlösung (1 mg/mL) ermittelt.

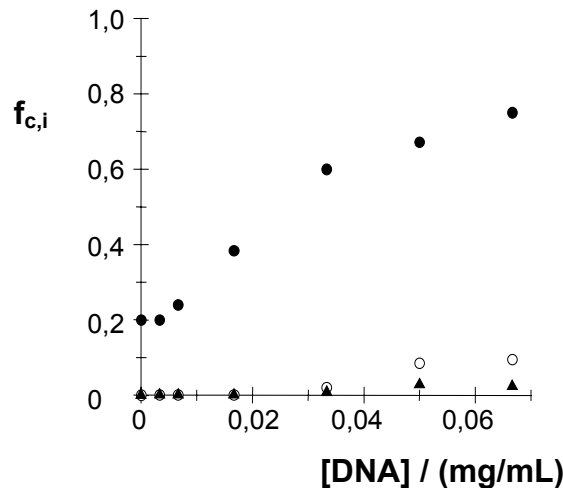


Abb. III.21: CHO-Pellets in 290 mM Sucrose, 3,75 mM KCl; Anteile durch GFP-Produktion grün fluoreszierender Zellen $f_{c,GFP}$ (○) 48 h nach Feldpulsapplikation, durch Feldpulsapplikation irreversibel geschädigter Zellen $f_{c,irrev}$ (●) und Anteile durch GFP-Produktion grün fluoreszierender Zellen f_{GFP} , bezogen auf die Gesamtheit der Zellen N_T vor Feldpulsapplikation (▲) in Abhängigkeit von der DNA-Konzentration (1 mg/mL DNA-Stammlösung, sterile Einmalküvetten mit Al-Elektroden, $l_n = 4 \text{ mm}$). $E_{1,appl} = 2,0 \text{ kV/cm}$, $t_{E1} = 0,5 \text{ ms}$; $E_{2,appl} = 0,15 \text{ kV/cm}$, $t_{E2} = 10 \text{ ms}$.

Die Anzahl transfizierter Zellen ist von der DNA-Konzentration abhängig. Irreversible Schädigung wirkt sich indirekt auf das Transfektionsergebnis aus. Die Verwendung von $0,05 \text{ mg/mL}$ DNA ist für das verwendete System optimal, da sich bei den benutzten Feldpulsparametern hier die meisten transfizierten Zellen ergeben.

(7.4) Verwendung von Edelstahlelektroden

In Abb. III.22 ist dargestellt, wie sich die Verwendung von Edelstahlelektroden (zur Vermeidung der Toxizität von Aluminiumionen und der bekannten starken Elektrodeneffekte bei Al-Elektroden (PLIQUETT et al., 1996)) auswirkt.

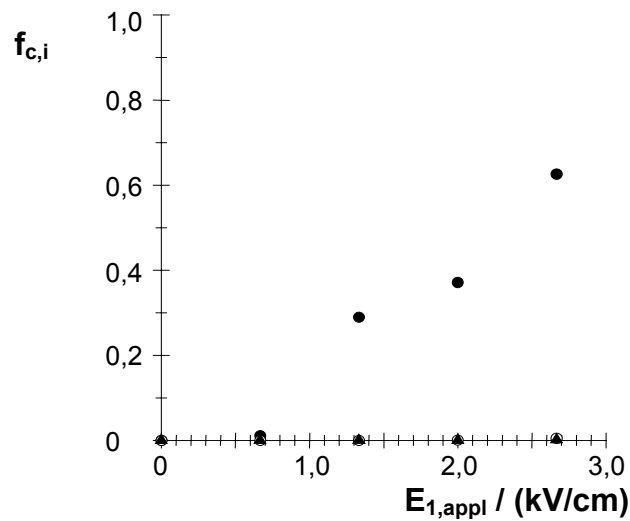


Abb. III.22: CHO-Pellets in 290 mM Sucrose, 3,75 mM KCl; Anteile durch GFP-Produktion grün fluoreszierender Zellen $f_{c,GFP}$ (○) 48 h nach Feldpulsapplikation, durch Feldpulsapplikation irreversibel geschädigter Zellen $f_{c,irrev}$ (●) und Anteile durch GFP-Produktion grün fluoreszierender Zellen f_{GFP} , bezogen auf die Gesamtheit der Zellen N_T vor Feldpulsapplikation (▲) nach Applikation der elektrischen Feldpulse mit Edelstahlelektroden; Pulsprotokoll analog Abb. III.20 a.

Bei Edelstahlelektroden in 290 mM Sucrose, 3,75 mM KCl tritt selbst unter Anwendung der zum elektroporativen DNA-Transfer ermittelten optimalen Pulsparameter nahezu keine Transfektion auf. Der Anteil irreversibel geschädigter Zellen nimmt gegenüber den Vergleichswerten bei Anwendung von Aluminiumelektroden ab.

Ein Agarosecoating der Elektrodenoberflächen führt nicht zu einer Verbesserung der Ausbeute.

(7.5) Einfluß des interstitiellen Mediums

Zugabe von $AlCl_3$ zum Sucrose-Medium

Bei Verwendung von Edelstahlelektroden erhöht die Zugabe von $AlCl_3$ den Transfektionserfolg, allerdings nicht in dem Maße wie bei Verwendung von Al-Elektroden.

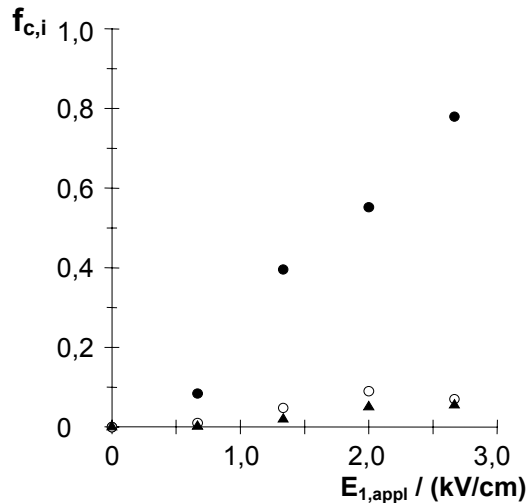


Abb. III.23: CHO-Pellets (vgl. Abb. III.22 a) in 290 mM Sucrose, 0,1 mM AlCl_3 ; Anteile durch GFP-Produktion grün fluoreszierender Zellen $f_{c,GFP}$ (○) 48 h nach Feldpulsapplikation, durch Feldpulsapplikation irreversibel geschädigter Zellen $f_{c,irrev}$ (●) und Anteile durch GFP-Produktion grün fluoreszierender Zellen f_{GFP} bezogen auf die Gesamtheit der Zellen N_T vor Feldpulsapplikation (▲); Applikation der elektrischen Feldpulse mit Edelstahlelektroden, $E_{2,appl} = 0,15 \text{ kV/cm}$, $t_{E2} = 10 \text{ ms}$, $t_{E1} = 0,5 \text{ ms}$.

Neben der Steigerung des Anteils transfizierter Zellen zeigt sich auch eine Steigerung des Anteils irreversibel geschädigter Zellen, welcher mit Erhöhung des Al^{3+} -Anteils deutlich zunimmt.

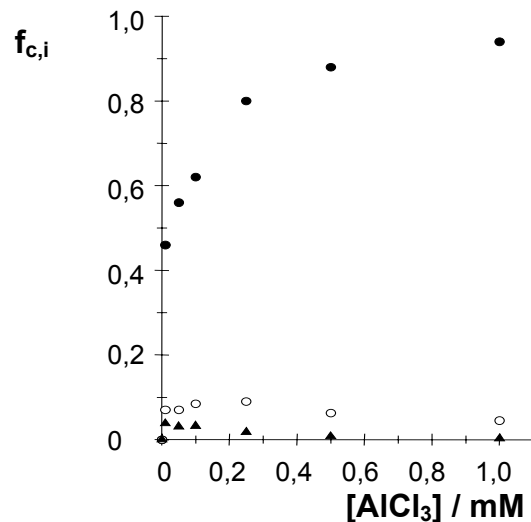


Abb. III.24: Anteile durch GFP-Produktion grün fluoreszierender Zellen $f_{c,GFP}$ (○) 48 h nach Feldpulsapplikation, durch Feldpulsapplikation irreversibel geschädigter Zellen $f_{c,irrev}$ (●) und Anteile durch GFP-Produktion grün fluoreszierender Zellen f_{GFP} , bezogen auf die Gesamtheit der Zellen N_T vor Feldpulsapplikation (▲); Applikation der elektrischen Feldpulse mit Edelstahlelektroden abhängig von der AlCl_3 -Konzentration (pH 7) im Elektroporations-medium; $E_{1,appl} = 2,0 \text{ kV/cm}$, $t_{E1} = 0,5 \text{ ms}$; $E_{2,appl} = 0,15 \text{ kV/cm}$, $t_{E2} = 10 \text{ ms}$

Agarose-Beschichtung von Al-Elektroden

Agarosebeschichtung von Al-Elektroden führt zu geringfügiger Verringerung des Anteils transfizierter und zur Verringerung des Anteils irreversibel geschädigter Zellen.

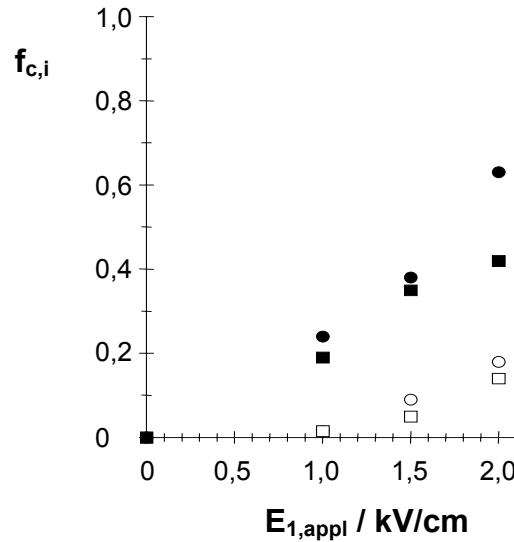


Abb. III.25: Anteile durch GFP-Produktion grün fluoreszierender Zellen $f_{c,GFP}$ (o, □) 48 h nach Feldpulsapplikation und irreversibel geschädigter Zellen $f_{c,irrev}$ (•, ■) nach Applikation der elektrischen Feldpulse mit Aluminiumelektroden mit (□, ■) und ohne (o, •) Agarose-Beschichtung; $E_{1,appl} = \text{s.o.}$, $t_{E1} = 0,5 \text{ ms}$; $E_{2,appl} = 0,15 \text{ kV/cm}$, $t_{E2} = 10 \text{ ms}$.

MgCl₂-Zusatz zum Sucrose-Medium

MgCl₂-Zusatz zum Sucrose-Medium führt bei Verwendung von Edelstahlelektroden ebenfalls nur zu einem geringen Transfektionserfolg.

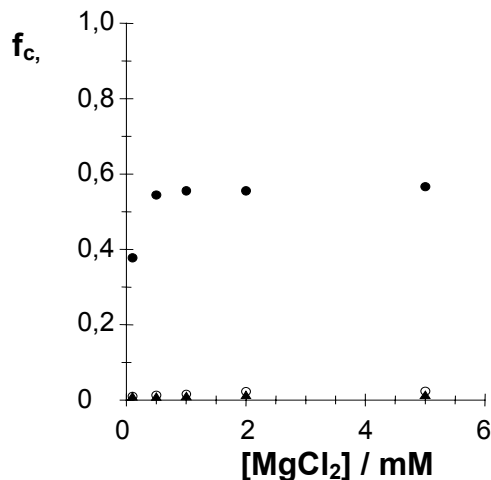


Abb. III.26: Anteile durch GFP-Produktion grün fluoreszierender Zellen $f_{c,GFP}$ (o) 48 h nach Feldpulsapplikation, durch Feldpulsapplikation irreversibel geschädigter Zellen $f_{c,irrev}$ (•) und Anteile durch GFP-Produktion grün fluoreszierender Zellen $f_{c,GFP}$, bezogen auf die Gesamtheit der Zellen N_T vor Feldpulsapplikation (▲); Applikation der elektrischen Feldpulse an CHO-Zell-Pellets mit Edelstahlelektroden ($l_n = 3 \text{ mm}$) abhängig von der MgCl₂-Konzentration im Elektroporationsmedium; isoosmolar durch Sucrose-Zugabe.

$E_{1,appl} = 2,0 \text{ kV/cm}$, $t_{E1} = 0,5 \text{ ms}$; $E_{2,appl} = 0,15 \text{ kV/cm}$, $t_{E2} = 10 \text{ ms}$.

PBS als Elektroporationsmedium

PBS gilt in der Biochemie als Standardmedium für den elektroporativen Gentransfer (LINDL, BAUER, 1994). Abb. III.27 zeigt, dass PBS als Elektroporationspuffer bei Verwendung von Edelstahlelektroden zur optimalen Transfektion bei relativ geringem Anteil geschädigter Zellen in 1:1-Mischung mit 290 mM Sucrose führt.

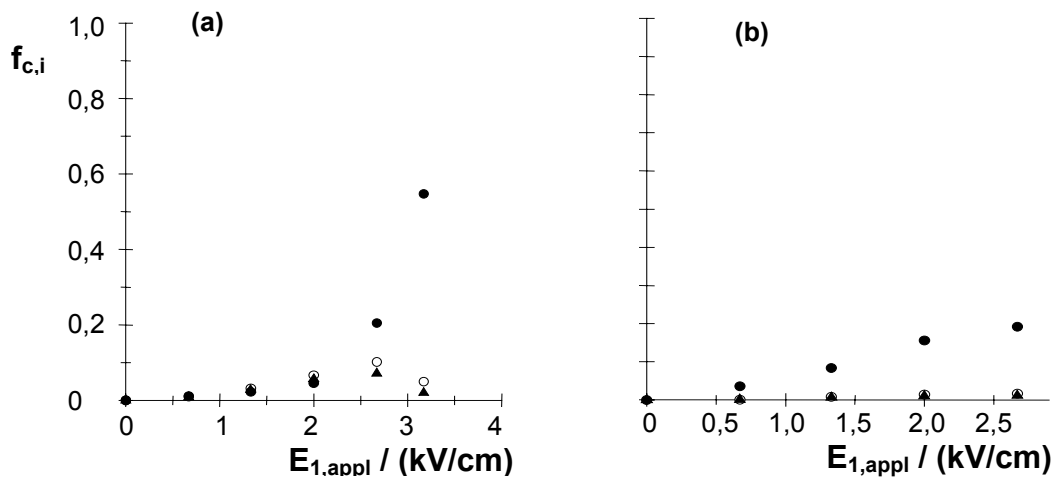


Abb. III.27: Anteile durch GFP-Produktion grün fluoreszierender Zellen $f_{c,GFP}$ (\circ) 48 h nach Feldpulsapplikation, durch Feldpulsapplikation irreversibel geschädigter Zellen $f_{c,irrev}$ (\bullet) und Anteile durch GFP-Produktion grün fluoreszierender Zellen f_{GFP} bezogen auf die Gesamtheit der Zellen N_T vor Feldpulsapplikation (\blacktriangle); Applikation der elektrischen Feldpulse an CHO-Pellets mit Edelstahlelektroden ($l_n = 3$ mm).

(a) 145 mM Sucrose, 75 mM PBS als Elektroporationsmedium,

(b) PBS als Elektroporationsmedium

$E_{1,appl} = \text{s.o.}$, $t_{E1} = 0,5$ ms; $E_{2,appl} = 0,15$ kV/cm, $t_{E2} = 10$ ms.

(7.6) Packungsdichte der Zellen

Mit der Erhöhung der Zentrifugalbeschleunigung RCF werden die Zellen am Küvettenboden dichter gepackt. Unter Beibehaltung der Pulsparameter resultiert diese Erhöhung der Packungsdichte in einer Verringerung des Anteils $f_{c,irrev}$ irreversibel geschädigter Zellen.

Gegenüber einer Suspension mit hier 6×10^7 Zellen/mL zeigt sich bereits bei 3,6 g neben der beschriebenen Abnahme des Anteils irreversibel geschädigter eine Erhöhung des Anteils $f_{c,GFP}$ transfizierter Zellen. Mit weiter zunehmender Packungsdichte nimmt $f_{c,GFP}$ ab, so daß schließlich geringere Werte als bei der Suspension erreicht werden.

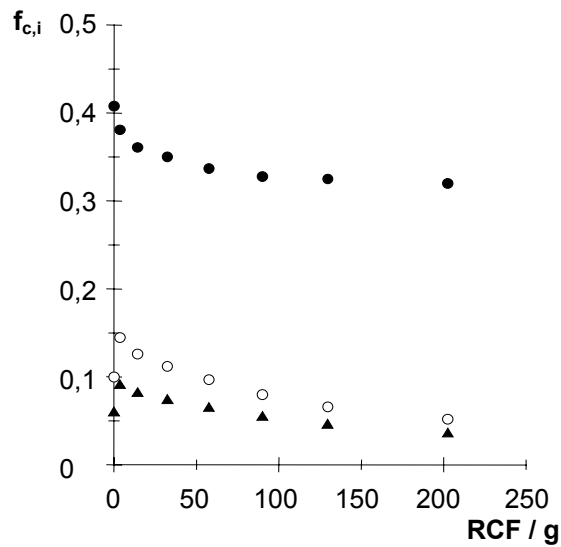


Abb. III.28: Anteile durch GFP-Produktion grün fluoreszierender Zellen $f_{c,GFP}$ 48 h nach Feldpulsapplikation (○), durch Feldpulsapplikation irreversibel geschädigter Zellen $f_{c,irrev}$ (●) und Anteile durch GFP-Produktion grün fluoreszierender Zellen f_{GFP} , bezogen auf die Gesamtheit der Zellen N_T vor Feldpulsapplikation (▲); Applikation der elektrischen Feldpulse mit Edelstahlelektroden.

Experimentelle Bedingungen:

8 Rechteckpulse (1 Hz) mit $E_{appl} = 2,0$ kV/cm und $t_E = 0,1$ ms; 75 mM PBS / 145 mM Sucrose als interstitielles Medium; Verwendung von Edelstahlelektroden, $l_n = 3$ mm.

Das extrazelluläre Medium der Zellsuspension bzw. des Überstandes der Zellpellets wird durch die optische Absorption charakterisiert.

Die charakteristische Absorption von DNA / RNA bei $\lambda = 260$ nm nimmt bei geringer Zentrifugalbeschleunigung gegenüber dem Vergleichswert der Suspension ab, aber bei $RCF \geq 14$ g zeigt sich eine erneute Zunahme.

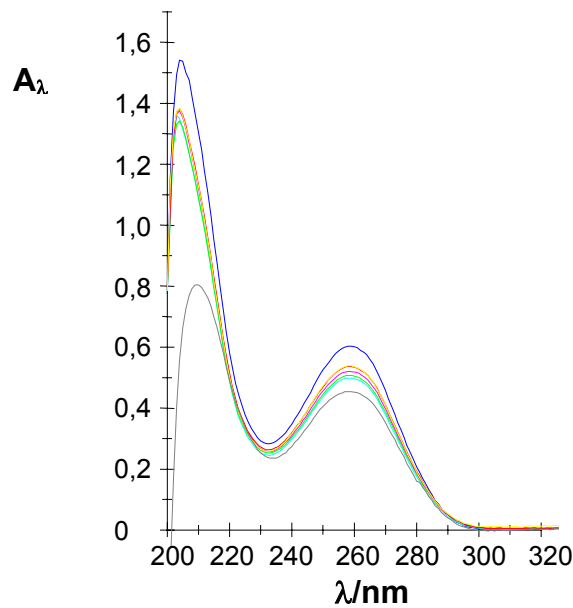


Abb. III.29: Absorptionsspektren des interstitiellen Mediums einer Suspension von 6×10^7 Zellen/mL (-) in 145 mM Sucrose, 75 mM PBS bzw. des Überstandes von Zellpellets nach fünfminütiger Zentrifugation bei RCF = 3,6 g (-); 14,4 g (-); 57,6 g (-); 90,0 g (-); 202,5 g (-); vor der Zentrifugation wurde jede Probe 10 min mit 75 μ g des GFP-Plasmids inkubiert, die Aufnahme der Spektren erfolgte nach Verdünnung 1:5. Das entsprechende Spektrum des interstitiellen Mediums ohne Zugabe von Fremd-Plasmid ist ebenfalls dargestellt (-).

Die Absorptionsbande um $\lambda = 260$ nm ohne Zugabe von Fremdplasmid deutet auf das Vorhandensein von CHO-Zell-DNA und -RNA im interstitiellen Medium hin. Diese ist auf den Anteil abgestorbener Zellen in der Probe zurückzuführen.

(7.7) Pulsform und Transfektionsergebnis

Es werden alternativ elektrische Feldpulse mit einem kurzen Hochvolt- (HV) und einem längeren Niedervoltanteil (NV) oder Serien von acht kurzen HV-Pulsen verwendet. Für Feldstärken $E_{\text{appl}} \leq 1,5$ kV/cm ergibt sich bei Applikation der acht Pulse an Zellpellets nahezu kein Transfektionserfolg, während die HV-LV-Pulse hier bereits zum Erfolg führen. Bei der hier verwendeten elektrischen Feldstärke $E_{\text{appl}} = 2,0$ kV/cm (HV) unterscheiden sich die Transfektionsergebnisse jedoch nicht signifikant:

HV-LV-Puls: $E_{1,\text{appl}} = 2,0$ kV/cm, $t_{E1} = 0,5$ ms, $E_{2,\text{appl}} = 0,15$ kV/cm, $t_{E2} = 10$ ms, RCF = 90 g:

$$f_{\text{c,GFP}} = 0,21$$

$$f_{\text{c,irrev}} = 0,06;$$

8 HV-Pulse: $E_{\text{appl}} = 2,0$ kV/cm, $t_E = 0,1$ ms, RCF = 90 g:

$$f_{\text{c,GFP}} = 0,19$$

$$f_{\text{c,irrev}} = 0,06 .$$

Bei Verwendung der 8 HV-Pulse ergibt Uni- bzw. Bipolarität bei den verwendeten Pulsparametern keinen signifikanten Unterschied bezüglich des Transfektionsergebnisses.

(8) Zellfusion

(8.1) CHO-Fusion

Nach Feldpulsapplikation an CHO-Suspensionen sind bei den gegebenen Bedingungen keine Zellfusionate zu erkennen.

Bei Applikation des elektrischen Feldpulses während der Zentrifugation, bzw. bei Proben, die vor und nach Feldpulsapplikation zentrifugiert werden, findet man Fusionate, d.h. mehrkernige Riesenzellen. Die Ausbeute fusionierter CHO-Zellen liegt lediglich im Bereich von $N_f/N_T < 0,05$.

N_f gibt hier die Anzahl an Fusionaten in einer Gesamtheit von N_T Zellen an.

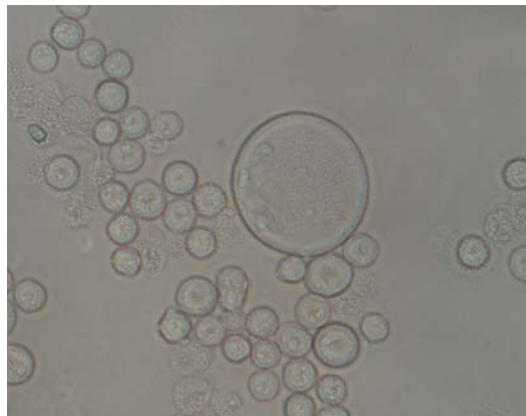


Abb. III.30: Fusionierte große und nicht fusionierte kleine CHO-Zellen: Die Zellen wurden vor und nach Feldpulsapplikation für 5 min bei 100 g zentrifugiert, Pulsprotokoll: 8 Rechteckpulse mit jeweils $t_E = 0,12$ ms, 1 Hz, Elektrodenabstand $l_n = 1$ mm (Edelstahlelektroden); Sucrose / PBS (1:1) als interstitielles Medium $T = 298$ K (20°C).

Mit Zelllinien wie z.B. ACHN und WT51 kann mit der gleichen Methode ein Anteil heterozygoter Fusionate von bis zu 30 % erzielt werden (Daten nicht aufgeführt).

(8.2) Fusion von *Dictyostelium discoideum*

Bei den Schleimpilzen *Dictyostelium discoideum* erfolgt die Kontaktbildung zwischen den Zellen durch mehrstündiges Umschwenken in Phosphatpuffer. Hierbei bilden sich Zellaggregate. Als Elektrodensystem dient hier eine Bügelkammer bestehend aus zwei parallelen Platindrähten mit einem Durchmesser $d = 0,1 \text{ mm}$ und einem Abstand $l_n = 0,2 \text{ mm}$.

Als Optimum für das betrachtete System konnte das folgende Pulsprotokoll ermittelt werden:

3 Pulse, $U_{\text{appl}} = 90 \text{ V}$, $t_E = 0,1 \text{ ms}$, 1 Hz . Hierbei ergibt sich ein Anteil von allenfalls 5 % getöteten Zellen bei Bildung großer Fusionate.

Durch GFP-Markierung bestimmter Zellkompartimente ist es möglich, das Verhalten während der Fusion im konfokalen Fluoreszenzmikroskop zu beobachten.

Als Beispiel sei hier die Fusion von *Dictyostelium discoideum* *Calnexin-GFP* gezeigt, wobei das Endoplasmatische Reticulum (ER) fluoreszent erkennbar ist.

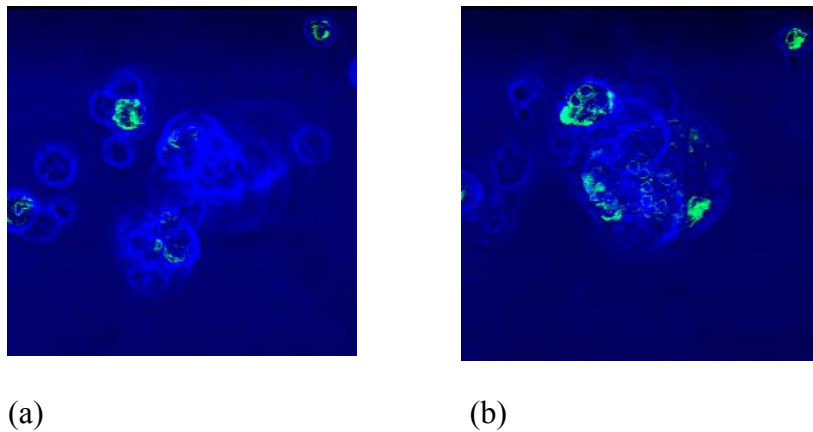


Abb. III.31: Konfokale Fluoreszenz von *Dictyostelium discoideum* *Calnexin-GFP* – Aggregaten (a) vor und (b) nach der elektroporativen Zellfusion. Drei Feldpulsen mit $U_n = 90 \text{ V}$, $t_E = 0,1 \text{ ms}$, 1 Hz .

Das dargestellte Fusionat zeigte ca. 18 Kerne. Weiterhin wird deutlich, daß das ER ebenfalls spontan fusioniert, es bleiben keine abgegrenzten Bereiche sichtbar.

IV. DATENANALYSE UND DISKUSSION

(1) Abhängigkeit der feldpulsinduzierten Permeabilisierbarkeit von der Zelldichte

Der elektroporative Transport sowohl makromolekularer Farbstoffe in die Zellen als auch kleiner Ionen aus den Zellen wird gegenüber suspendierten Zellen bei einer Erhöhung der Packungsdichte verringert (III.1.).

Für suspendierte sphärische Zellen mit dem Radius \bar{a}_c ergibt sich die induzierte Transmembranpotential-Differenz $\Delta\phi_{ind}$ nach der (modifizierten) Fricke-Gleichung [FRICKE, 1953, MAXWELL, 1904]

$$\Delta\phi_{ind}(\theta) = - 3/2 \cdot f_\lambda \cdot \bar{a}_c \cdot E_{nom} \cdot |\cos\theta| \quad (IV.1)$$

als der elektrische Potentialabfall in Richtung des (vektoriellen) externen Feldes $E_{nom} = U_{nom} / l_n$. θ ist der Winkel des betrachteten Ortes auf der Membran mit der Feldlinienrichtung. Da der mittlere Radius biologischer Zellen \bar{a}_c im μm -Bereich liegt und die Dicke der Lipidmembran $d_m = 5 \text{ nm}$ beträgt, gilt $\bar{a}_c \gg d_m$ und damit für den Leitfähigkeitsterm $f_\lambda = 1 - \lambda_m [(\bar{a}_c/d_m)(2 + \lambda_{in}/\lambda_{ex})] / (2\lambda_{in})$, wobei λ_{in} und λ_{ex} jeweils die Leitfähigkeiten des extra- und intrazellulären Mediums und $\lambda_m = d_m \cdot G_m$ die Membranleitfähigkeit sind. Die spezifische Membranleitwert G_m^0 bei $E_{appl} = 0$ liegt im Bereich $1 \leq G_m^0 / (\text{mS} \cdot \text{cm}^{-2}) \leq 100$ [SCHWAN, 1957]. Weil für das hier betrachtete System $\lambda_{in} \approx 20 \lambda_{ex}$ gilt, läßt sich der Leitfähigkeitsterm vereinfacht ausdrücken als $f_\lambda = 1 - \lambda_m \cdot (\bar{a}_c/d_m) / (2\lambda_{ex})$. Für die Polkappen ($|\cos\theta| = 1$) suspendierter Zellen reduziert sich Gl. (IV.1) zu

$$\Delta\phi_{ind}(s) = -1,5 \cdot \bar{a}_c \cdot E_{nom} \cdot f_\lambda \quad (IV.2)$$

Ein dicht gepacktes Zellpellet ist vereinfacht mit einem Ersatzschaltbild aus parallelen Serien von Widerständen beschreibbar. Dabei repräsentiert jeder Widerstand eine Membranebene senkrecht zur Feldlinienrichtung zwischen den planparallelen Elektroden mit Abstand l_n . Jede Zellschicht trägt also mit zwei solchen Widerständen zum Gesamtwiderstand bei [ABIDOR, 1994].

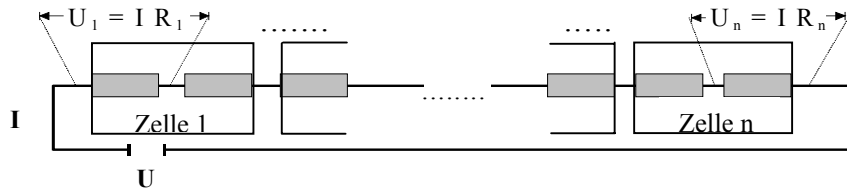


Abb. IV.1: Vereinfachtes Ersatzschaltbild für dicht gepackte Zellen; jeder Widerstand repräsentiert eine Membranebene senkrecht zur Feldlinienrichtung, damit trägt jede Zellschicht mit zwei solchen Widerständen zum Gesamtwiderstand bei. Ein dicht gepacktes Zellpellet läßt sich darstellen als mehrere parallele Ketten von Widerständen.

Nach diesem Modell beträgt die induzierte Transmembranpotential-Differenz für dicht gepackte Zellen im Pellet $\Delta\phi_{\text{ind}}(p) = -U_{\text{nom}} / 2n$, wobei $n = l_n / (2\bar{a}_c)$ die Anzahl der Zellschichten zwischen den Elektroden ist, U_{nom} ist die Spannung zwischen den (Puls-) Elektroden. Durch Einsetzen ergibt sich

$$\Delta\phi_{\text{ind}}(p) = -E_{\text{nom}} \cdot \bar{a}_c \cdot f_\lambda \quad , \quad (\text{IV.3})$$

mit $E_{\text{nom}} = U_{\text{nom}} / l_n$.

Mit Hilfe der Gleichungen (IV.2) und (IV.3) läßt sich somit zeigen, daß eine dichte Zellpackung die Transmembranpotential-Differenz an den Polkappen bei gegebener äußerer Spannung um den Faktor 2/3 reduziert:

$$\Delta\phi_{\text{ind}}(s) = \frac{3}{2} \Delta\phi_{\text{ind}}(p) \quad . \quad (\text{IV.4})$$

Je nach Packungsdichte der Zellen gilt für den Formfaktor F in $\Delta\phi_{\text{ind}}(\theta) = -F \cdot f_\lambda \cdot \bar{a}_c \cdot E_{\text{nom}} \cdot |\cos\theta|$ somit $1,5 \geq F \geq 1,0$.

Eine dichte Kugelpackung verringert E_m also maximal um einen Faktor 2/3 gegenüber Zellen in Suspension. Damit ist die porierte Fläche kleiner und der Transmembrantransport geringer.

(2) Leitfähigkeitsänderungen

(2.1) Leitfähigkeitsänderungen während Feldpulsapplikation

Leitfähigkeitsrelaxationen im elektrischen Feld

In einem Medium geringer Leitfähigkeit wie 290 mM Sucrose ist ein Leitfähigkeitsanstieg sowohl während als auch nach der Feldpulsapplikation meßbar.

Die relativen Leitfähigkeitsänderungen $Y(t)$ während des Felpulses werden zunächst mittels einer kinetischen Normalmoden-Analyse [EIGEN, DE MAYER, 1963] mit dem Ansatz $Y(t) =$

$\sum Y_i(t) = \sum Y_i(1 - \exp[-t/\tau_i])$ ausgewertet, wobei Y_i die Amplitude und τ_i die Relaxationszeit der Mode i sind.

Angewendet auf die Einfeld-Leitfähigkeitsänderungen läßt sich hier der allgemeine Ansatz (vereinfacht) ausdrücken als

$$Y(t) = Y_1 + Y_2(1 - \exp[-t/\tau_2]) + Y_3(t) \quad . \quad (\text{IV.5a})$$

mit

$$Y_3(t) = Y_3(1 - \frac{\tau_3}{\tau_3 - \tau_2} \exp[-t/\tau_3] + \frac{\tau_2}{\tau_3 - \tau_2} \exp[-t/\tau_2]) \quad , \quad (\text{IV.5b})$$

wobei Y_2 und Y_3 die Amplituden und τ_2 und τ_3 die Relaxationszeiten der Moden (2) und (3) sind. Die Bildung der P_3 -Poren erfolgt scheinbar auf Kosten einiger P_2 -Poren (vgl. Gl. IV.5b). Die Leitwertdaten zeigen, daß $\tau_3 \gg \tau_2$, damit ist es praktisch, im Zeitbereich $t > \tau_2$ den Steigungs-Parameter $m_3 = Y_3(t) / (t - \tau_2)$ zu verwenden, mit $Y_3(t = \tau_2) \equiv 0$. Weiterhin gilt natürlich $Y_3(t = 0) = 0$. In dem kurzen Zeitbereich $0 \leq t < \tau_3$ gelten die Näherungen $Y_3(1 - \exp[-t/\tau_3]) \approx Y_3 t / \tau_3 = m_3 t$ und $\tau_2(\exp[-t/\tau_2] - \exp[-t/\tau_3]) \approx -\tau_2(1 - \exp[-t/\tau_2])$ und Gl. (IV.5b) vereinfacht sich zu

$$Y_3(t) = m_3 (t - \tau_2 (1 - \exp[-t/\tau_2])) \quad . \quad (\text{IV.6})$$

Das Verhältnis $Y_3(t) / Y_3$ ist gleich dem Verhältnis $(f_3(t) - f_3^0) / (f_3 - f_3^0)$ der Anteile der P_3 -Poren. Die Geradensteigung $m_3 = Y_3/\tau_3$ ist das Verhältnis aus der Amplitude Y_3 und der Relaxationszeit τ_3 .

Die einzelnen Beiträge zur experimentellen Einfeld-Kurve sind am Beispiel der applizierten Feldstärke $E_{\text{appl}} = 1,5 \text{ kV/cm}$ in Abb. IV.2 dargestellt.

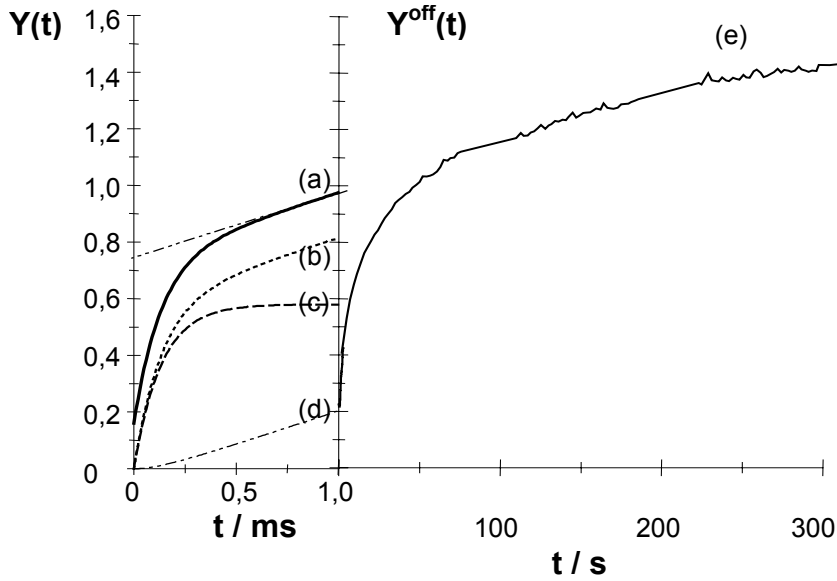


Abb. IV.2: Visualisierung der kinetischen Normalmoden-Analyse der gemessenen Leitfähigkeits-änderungen $Y(t) = \Delta\lambda(t) / \lambda_0$ (Kurven (a) und (e)) während und nach Applikation eines Feldpulses der Feldstärke $E_{\text{appl}} = 1,5 \text{ kV/cm}$ und der Pulsdauer $t_E = 1 \text{ ms}$ an ein CHO-Zellpellet in 290 mM Sucrose als Funktion der Zeit t ; $\lambda_0 = 0,09 \text{ mS/cm}$ bei $T = 293 \text{ K}$ (20°C). Die experimentelle Einfeld-Kurve (a) wird beschrieben durch die Gln. (IV.5) und (IV.6), die Kurve (b) bezieht sich auf $Y(t) - Y_1 = Y_2(t) + Y_3(t)$, die Kurven (c) und (d) zeigen die feldinduzierte Bildung von Membranporen, $Y_2(t) = Y_2 (1 - \exp[-t/\tau_2])$ und $Y_3(t) = m_3 (t - \tau_2 (1 - \exp[-t/\tau_2]))$.

Im untersuchten Feldstärkebereich steigen die Amplituden Y_1 , Y_2 und die Steigung m_3 der Mode (3) als linearer Anteil der Kurve (a) für $t \gg \tau_2$ mit Erhöhung der Feldstärke an (Abb. IV.3). Die Relaxationsrate $1/\tau_2$ steigt ebenfalls mit steigender Feldstärke bzw. τ_2 wird kleiner.

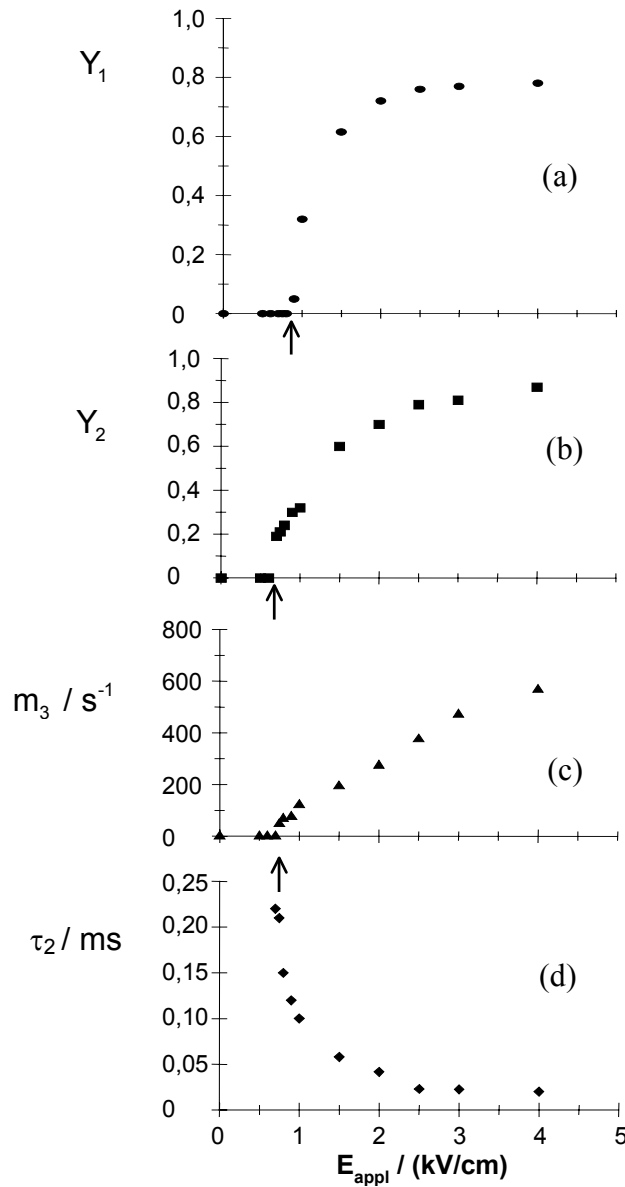


Abb. IV.3: Amplituden Y_1 , Y_2 , Steigung m_3 und Relaxationszeit τ_2 der jeweiligen Normalmoden der Leitfähigkeitsänderungen während Feldpulsapplikation ($t_E = 1$ ms) an CHO-Pellets in 290 mM Sucrose als Funktion der applizierten Feldstärke $E_{\text{appl}} = U_{\text{appl}} / l_n$; Elektrodenabstand $l_n = 1$ mm. Die jeweiligen Schwellenwerte betragen $E_{\text{th}}(1) = 0,9 \pm 0,05$ kV/cm für die Phase (1), $E_{\text{th}}(2) = E_{\text{th}}(3) = 0,70 \pm 0,05$ kV/cm für die Phasen (2) und (3).

Die in Abb. IV.3 dargestellten Feldstärkeabhängigkeiten der kinetischen Parameter Y_2 , τ_2 und m_3 ähneln stark den von GRIESE et al. (2002) an salzgefüllten Lipidvesikeln ermittelten Daten. Die schnelle Mode Y_1 wurde jedoch bei den dort durchgeführten Differenzmessungen mit zwei identischen Kammern, von denen eine mit einer Suspension salzgefüllter und eine mit salzfreien, sucrosegefüllten Vesikeln bestückt waren, nicht gefunden. Dieser Leitfähigkeitsterm Y_1 ist konsistent mit Oberflächenprozessen einschließlich der Wien-Effekte [MÜLLER et al., 1989],

also Störungen der Ionenatmosphäre der hauptsächlich negativ geladenen Zelloberfläche, sowie der Trennung von Ionenpaaren aufgrund der hohen lokalen Feldstärken. Bei Applikation elektrischer Feldpulse auf abgestorbene Zellen mit permanent permeablen Membranen sind im betrachteten Feldstärkebereich keine Leitfähigkeitsänderungen meßbar. Hier ist aufgrund der Permeabilität der erhöhte Potentialabfall $\Delta\phi_m$ über die Membran nicht gegeben.

Die kinetisch auflösbaren Leitfähigkeitsmoden Y_2 und Y_3 zeigen beide alle Merkmale einer Bildung von Membranporen im elektrischen Feld [GRIESE et al. (2002)].

Alle drei Relaxationsmoden weisen scheinbare Schwellenwerte auf. Die Relaxationsmoden (2) und (3) haben die gleichen apparenten Schwellen-Feldstärken: $E_{th}(2) = E_{th}(3) = 0,7 (\pm 0,1)$ kV/cm, während sich für die Mode (1) $E_{th}(1) = 0,9 (\pm 0,1)$ kV/cm ergibt. Vom jeweiligen Schwellenwert an steigen Y_2 und m_3 mit steigender Feldstärke und gehen bei hohen Feldstärken in Sättigung. Dieses Sättigungsverhalten ist konsistent mit einem Anstieg der Membranleitfähigkeit λ_m , wodurch die Erhöhung der Membranspannung U_m begrenzt wird. Dieses Verhalten spiegelt sich in der Feldstärkeabhängigkeit des Leitfähigkeitsfaktors f_λ wider (s.u.).

Die gemessenen Leitfähigkeitsdaten $\lambda(t) = \lambda_0 + \sum_i \Delta\lambda_i = \lambda_0(1 + \sum Y_i)$ mit $\Delta\lambda_i = \lambda_i - \lambda_{i-1}$ sind hier der Übersichtlichkeit und Vergleichbarkeit wegen als relative Änderungen $Y_i = \Delta\lambda_i / \lambda_0$ dargestellt.

Da die kinetische Phase $\Delta\lambda_1 = \lambda_0(1+Y_1)$ nicht mit der Membranleitfähigkeit λ_m zusammenhängt, wird $\lambda(t)$ nun durch die Größe $\lambda'(t) = \lambda(t) - \Delta\lambda_1$ ausgedrückt. Man erhält somit $\lambda'_i(t) = \lambda_0 + \sum_i \Delta\lambda_i$ für $i = 2, 3$, also:

$$\lambda'_2(t) = \lambda_0 + \Delta\lambda_2(t) \quad , \quad \lambda'_3(t) = \lambda_0 + \Delta\lambda_2 + \Delta\lambda_3 \quad . \quad (IV.7)$$

Die Größe $\lambda'_i(t)$ wird später für die Berechnung der jeweiligen Membranleitfähigkeiten $\lambda_{m,i}$ benötigt.

Die einzelnen feldinduzierten Änderungen $\Delta\lambda_i$ schließlich ergeben die kinetischen Normalmoden für $i = 2, 3$, gemäß $\Delta\lambda_i(t) = \lambda_i(t) - \lambda_{i-1} = \lambda'_i(t) - \lambda'_{i-1}$:

$$\Delta\lambda_2(t) = \lambda'_2(t) - \lambda_0 \quad , \quad \Delta\lambda_3(t) = \lambda'_3(t) - \lambda'_2 \quad , \quad (IV.8)$$

wobei $\lambda'_1 = \lambda_0$ gelten muß und λ'_2 der (zeitunabhängige) Maximalwert von $\lambda'_2(t)$ ist.

Allgemeine chemische Elektrothermodynamik

Physikalisch-chemisch wird der Prozeß der Poren-Bildung und –Ausheilung betrachtet als ein lokaler, kooperativer Strukturübergang von n Lipidmolekülen (L) und Wasser (W) unter Bildung eines Porenclusters $L_n(W)$. Wird ein Lipid in einer Monoschicht durch Wasser ersetzt, bilden $n \geq 12$ Lipide eine Pore in beiden Monoschichten, gemäß dem Schema $nL + W \rightleftharpoons L_n(W)$.

Die feldinduzierte Bildung von Membranporen beinhaltet verschiedene geschlossene (C) und porierte (P) Membranzustände (bzw. Cluster $L_n(W)$). Das entsprechende Minimal-Schema [NEUMANN, KAKORIN, 2000] ist $(C) \rightleftharpoons (P)$. Die Global-Verteilungskonstante $K = [(P)] / [(C)]$ und der (Global-) Porationsgrad $f = [(P)] / [(P)] + [(C)]$ sind verknüpft mit der Energetik der Reaktion nach:

$$K = \frac{f}{1-f} = \exp\left[\frac{-\Delta_R \hat{G}^\ominus}{RT}\right] \quad , \quad (IV.9)$$

wobei $\Delta_R \hat{G}^\ominus = \hat{G}^\ominus(P) - \hat{G}^\ominus(C)$ der Standardwert der transformierten Reaktions-Gibbsenergie; $R = k_B \cdot N_A$, k_B die Boltzmannkonstante, N_A die Avogadrokonstante und T die absolute Temperatur sind. Mit der Legendre-Transformation $\hat{G} = G - EM$, wobei M das elektrische (Dipol-) Moment ist, gilt für die Gibbs-Reaktionsenergie in Gl. (IV.9):

$$\Delta_R \hat{G}^\ominus = \Delta_R G^\ominus - \int \Delta_R M^\ominus dE_m \quad . \quad (IV.10)$$

E_m ist das (Maxwell-) Membranfeld. Der konventionelle Gibbs-Reaktionsenergieterm $\Delta_R G^\ominus$ beinhaltet die diversen nichtelektrischen Beiträge, wie z.B. die Linien- und Oberflächenspannung, die Krümmung etc. [NEUMANN, KAKORIN, 2000]. Die elektrische Polarisationsenergie $\Delta_R G_{el}^\ominus = - \int \Delta_R M^\ominus dE_m = \Delta_R \hat{G}^\ominus - \Delta_R G^\ominus$ beinhaltet das Standard-Reaktions-Dipolmoment $\Delta_R M^\ominus = M^\ominus(P) - M^\ominus(C)$ als Differenz zwischen den molaren Momenten der porierten und geschlossenen Membranzustände.

Elektrothermodynamik gekoppelter Porierungsschritte

MEP - Reaktionsschema

Wie bereits erwähnt, haben die beiden Moden $\Delta\lambda_2(t)$ und $\Delta\lambda_3(t)$, dokumentiert als $Y_2(t)$ und $Y_3(t)$, unterschiedliche Relaxationszeiten $\tau_2 \ll \tau_3$, mit $\tau_3 = Y_3 / m_3$. Der apparente Schwellenwert der elektrischen Feldstärke ist aber derselbe. Diese Merkmale sind konsistent mit mindestens zwei verschiedenen, gekoppelten Porenzuständen P_2 und P_3 . Somit muß das globale Schema $(C) \rightleftharpoons (P)$ spezifiziert werden als eine zweischrittige Reaktionssequenz $(C) \rightleftharpoons P_2 \rightleftharpoons P_3$, wobei der Übergang $(C) \rightleftharpoons P_2$ offensichtlich wesentlich schneller ist als der Porenübergang

$P_2 \rightleftharpoons P_3$. Die physikalische Deutung der schnellen Relaxationsmode bedingt die Annahme mindestens eines Zwischenzustandes C_1 , zusätzlich zu C . Das minimale Reaktionsschema für die physikalisch-chemische Beschreibung der Daten ist damit die dreischrittige Reaktionskaskade



In diesem Schema wird der schnelle Schritt $C \rightleftharpoons C_1$ durch den sehr schnellen Zwischenschritt $C_1 \rightleftharpoons P_2$ an den langsamen Übergang $P_2 \rightleftharpoons P_3$ gekoppelt. Die intrinsischen Prozesse i lassen sich durch die (intrinsischen) Gleichgewichtskonstanten $K'_i = k'_i / k'_{-i}$ als Konzentrationsverhältnisse bzw. durch die Relaxationsraten $1/\tau'_i = k'_i + k'_{-i}$ charakterisieren, wobei k'_i und k'_{-i} jeweils die (intrinsischen) Geschwindigkeitskoeffizienten des Vor- und Rückwärtsschrittes sind:

$$\begin{aligned} K'_1 &= [C_1] / [C] = k'_1 / k'_{-1} \quad , & 1/\tau'_1 &= k'_1 + k'_{-1} \\ K'_2 &= [P_2] / [C_1] = k'_2 / k'_{-2} \quad , & 1/\tau'_2 &= k'_2 + k'_{-2} \\ K'_3 &= [P_3] / [P_2] = k'_3 / k'_{-3} \quad , & 1/\tau'_3 &= k'_3 + k'_{-3} \end{aligned}$$

Die (schnelle) Normalmode (2)

Die schnelle Relaxationsmode (2) bezieht sich auf die Sequenz



Die Geschwindigkeitsgesetze für die Einzelschritte in Schema (IV.12) lauten:

$$\frac{d[C]}{dt} = -k'_1 [C] + k'_{-1} [C_1] \quad , \quad \frac{d[P_2]}{dt} = -k'_{-2} [P_2] + k'_2 [C_1] \quad . \quad (IV.13)$$

Ausgedrückt als zeitliche Abweichungen $\delta c_i = c_i(t) - \bar{c}_i$ vom jeweiligen Gleichgewichtswert \bar{c}_i erhält man

$$\frac{d\delta[C]}{dt} = -k'_1 \delta[C] + k'_{-1} \delta[C_1] \quad , \quad \frac{d\delta[P_2]}{dt} = -k'_{-2} \delta[P_2] + k'_2 \delta[C_1] \quad (IV.14)$$

Aufgrund des Massenerhalts muß $\delta[C] + \delta[C_1] + \delta[P_2] = 0$ und damit $\delta[C_1] = -\delta[C] - \delta[P_2]$ gelten.

Nimmt man für den Übergang $C \rightleftharpoons C_1$ im Gleichgewicht $d[P_2] / dt = 0$ an, ist die Beziehung $\delta[P_2] = K'_2 \cdot \delta[C_1]$ anwendbar. Nach Substitution von $\delta[C_1] = \delta[P_2] / K'_2$ in die Gleichungen (IV.14) erhält man dann

$$\frac{d\delta[C]}{dt} = - \left(k'_1 + k'_{-1} \cdot \frac{1}{1 + K'_2} \right) \delta[C] = - \frac{1}{\tau_2} \delta[C] \quad , \quad (IV.15)$$

Einsetzen von $\delta[C] = -\delta([P_2] + [C_1]) = -\delta([P_2] (1+K'_2) / K'_2)$ in Gl. (IV.15) führt zu

$$\frac{d\delta([P_2])}{dt} = -\frac{1}{\tau_2} \cdot \delta[P_2] \quad (IV.16)$$

Integration mit den Grenzen $t = 0$ und t ergibt

$$\delta[P_2(t)] = \delta[P_2^0] \cdot \exp[-t/\tau_2] , \quad (IV.17)$$

mit $\delta[P_2(t)] = [P_2(t)] - [\bar{P}]$ und der maximalen Abweichung $\delta[P_2^0] = [P_2^0] - [\bar{P}]$. Die hochgestellte Null bezieht sich hier auf $t = 0$ und der Querstrich in $[\bar{P}]$ auf den Gleichgewichtswert bei $t \rightarrow \infty$.

Durch Einsetzen erhält man schließlich $[P_2(t)] - [\bar{P}] = ([P_2^0] - [\bar{P}]) \cdot \exp[-t/\tau_2]$.

Das Verhältnis $\tau_2^0 \ll \tau_3^0$ rechtfertigt es, die schnelle Reaktionssequenz im ersten Teil der Leitfähigkeitsrelaxation $\Delta\lambda_2(t)$ als weitgehend unbeeinflusst von der geringen Änderung $\Delta[P_3]$ im langsamen Schritt $P_2 \rightleftharpoons P_3$ anzunehmen. Die Feldabhängigkeit der Relaxationsrate $1/\tau_2$ legt nahe, daß die Mode (2) den geschwindigkeitsbestimmenden, schnellen Schritt $C \rightleftharpoons C_1$, gekoppelt an den sehr schnellen Schritt $C_1 \rightleftharpoons P_2$ beinhaltet. Die (Gesamt-) Gleichgewichtskonstante für die gekoppelten Schritte der Mode (2) in (IV.11) ist damit

$$K_2 = \frac{[P_2]}{([C] + [C_1])} = \frac{f_2}{1 - f_2} . \quad (IV.18)$$

Die feldinduzierten Änderungen $\Delta\lambda_m$ der Membranleitfähigkeit λ_m hängen zusammen mit Änderungen Δf_i der Anteile f_i der Poren an der Membranfläche. λ_m bezieht sich auf alle Membranzustände, die Konzentrations-Summe $c_0 = ([C] + [C_1]) + ([P_2] + [P_3])$ enthält somit den ionenleitenden, porierten $([P_2] + [P_3])$ und den aufgrund von Leckstellen leitfähigen Anteil $([C] + [C_1])$. Damit ergeben sich die jeweiligen Fraktionen porierter Membranfläche

$$f_2 = [P_2] / c_0 , \quad f_3 = [P_3] / c_0 . \quad (IV.19)$$

Durch Substitution erhält man $f_2 = K_2 / (1 + K_2(1+K'_3))$ und $K_2 = K'_2 K'_1 / (1 + K'_1)$, wobei mit $K'_1 \gg 1$ und $K'_2 \ll 1$ $K_2 = K'_2$ gilt.

Feldabhängigkeit der Amplitude der Porenfraktion f_2

In dem verwendeten analytischen Konzept gibt die Leitfähigkeitsrelaxation $\Delta\lambda_2(t) = \Delta\lambda_2(1 - \exp[-t/\tau_2])$ die Membranleitfähigkeitsmode $\Delta\lambda_{m,2}(t)$ wieder, deren Rate durch die strukturelle Mode

$$f_2(t) - f_2^0 = (f_2 - f_2^0)(1 - \exp[-t/\tau_2]) \quad (IV.20)$$

bestimmt wird. f_2 ist hierbei die Amplitude der $f_2(t)$ - Relaxation und f_2^0 die Porenfraktion bei $E_{appl} = 0$.

Elektrothermodynamisch ist die isotherme, isobare Feldabhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten K_2 vom (Maxwell-) Membranfeld nach der van't Hoff – ähnlichen Beziehung:

$$\left(\frac{\partial \ln K_2}{\partial E_m} \right)_{p,T} = \frac{\Delta_R M^\ominus}{RT} \quad . \quad (IV.21)$$

Integration in den Grenzen $E_m = 0$, bzgl. $K_2^0 = f_2^0/(1-f_2^0) = \exp[-\Delta_R G^\ominus/RT]$ und E_m ergibt den elektrischen Feldexponenten [NEUMANN, 2004]:

$$X^\ominus = \ln \frac{K_2}{K_2^0} = \frac{\int_0^{E_m} \Delta_R M^\ominus dE_m}{RT} \quad . \quad (IV.22)$$

Nach ABIDOR et al. (1979) kann man die Bildung von Membranporen betrachten als Eintritt von Wasser der Dielektrizitätskonstante ϵ_w in die Lipidmembran, wobei ein äquivalentes Volumen der Lipidphase mit der Dielektrizitätskonstante ϵ_L ersetzt wird.

Die Polarisierungstheorie [BÖTTCHER, 1973] definiert die dielektrische Polarisierung $P = M / V$ als das Dipolmoment pro Volumen. Für jede homogene Phase gilt $P = \epsilon_0(\epsilon - 1) \cdot E$, wobei E das Maxwellfeld der Phase darstellt. Eine Änderung des Materials innerhalb des Volumens V der Phase führt zu einer Änderung des Momentes $\Delta M = V \cdot \Delta P = V \epsilon_0 \Delta \epsilon \cdot E$ mit $\Delta \epsilon = \epsilon_w - \epsilon_L$.

Dabei ist die Polarisationsenergie proportional zu der Differenz ($\epsilon_w - \epsilon_L$). Wendet man dieses Konzept auf das Schema (C) \rightleftharpoons (P) an, ist das (Gesamt-) Reaktionsmoment

$$\Delta_R M^\ominus = V_{P,C} \cdot \Delta_R P^\ominus \quad . \quad (IV.23)$$

Die (molare) Reaktions-Polarisation ist $\Delta_R P^\ominus = N_A \cdot \epsilon_0(\epsilon_w - \epsilon_L) E_m$, mit der Vakuumpermittivität ϵ_0 . Durch Substitution und Integration erhält man aus Gl. (IV.22)

$$X^\ominus = \frac{V_{P,C} \cdot \epsilon_0(\epsilon_w - \epsilon_L)}{2k_B T} E_m^2 \quad . \quad (IV.24)$$

Unter Verwendung der Pellet-Näherung beträgt die Membranfeldstärke

$$E_m = -\frac{\Delta \phi_{ind}(P)}{d_m} = \frac{\bar{a}_c \cdot f_{\lambda,2} \cdot E_{nom}}{d_m} \quad . \quad (IV.25)$$

Für zylindrische P_2 -Poren mit dem Volumen $V_{2,0} = \pi \cdot \bar{r}_2^2 \cdot d_m$ beträgt der mittlere Porenradius

$$\bar{r}_2 = (\bar{r}_2^2)^{1/2} = (V_{2,0} / \pi d_m)^{1/2} \quad . \quad (IV.26)$$

Substitution von Gl. (IV.25) in (IV.24) ergibt $X^\ominus = b_{2,0}^0 f_{\lambda,2}^2 E^2$ und aus Gl. (IV.22) erhält man

$$K = K_2^0 \cdot \exp[b_{2,0}^0 \cdot f_{\lambda,2}^2 \cdot E_{nom}^2] \quad , \quad (IV.27)$$

wobei der Feldterm $b_{2,0}^0 = b_{2,0} / f_{\lambda,2}^2$ gegeben ist als

$$b_{2,0}^0 = \frac{V_{2,0} \cdot \varepsilon_0 (\varepsilon_w - \varepsilon_L) \bar{a}_c^2}{2k_B T \cdot d_m^2} \quad . \quad (\text{IV.28})$$

Bei der Elektroporation von Zellen oder Lipidvesikeln übersteigt der Gesamtoberflächenanteil der Membranporen erfahrungsgemäß nicht die Größenordnung 10^{-2} [GRIESE et al., 2002], damit ist $f_i \ll 1$ und $K_i = f_i / (1-f_i) = f_i$ und schließlich

$$\frac{f_2}{f_2^0} = \frac{K_2}{K_2^0} = \exp[b_{2,0}^0 \cdot f_{\lambda,2}^2 \cdot E_{\text{nom}}^2] \quad (\text{IV.29})$$

Der Term $b_{2,0}^0 = b_{2,0}/f_{\lambda,2}^2$ enthält $V_{2,0} = V_2(P_2) - V_0(C, C_1)$, das Reaktionsvolumen des Überganges $(C, C_1) \rightarrow P_2$, woraus sich der mittlere Porenradius \bar{r}_2 ergibt (vgl. Gl. (IV.26)).

Die Relaxationsrate $1/\tau_2$

Beinhaltet die strukturelle Relaxation den sehr schnellen Gleichgewichtsschritt $C_1 \rightleftharpoons P_2$, gekoppelt an den langsameren Übergang $C \rightleftharpoons C_1$, ist die Relaxationsrate $1/\tau_2$ in Gl. (IV.20)

$$\frac{1}{\tau_2} = k_2 + k_{-2} = k'_1 + k'_{-1} \cdot \frac{1}{1+K'_2} \quad , \quad (\text{IV.30})$$

wobei die Ratenkoeffizienten gegeben sind durch $k_2 = k'_1$ und $k_{-2} = k'_{-1}/(1+K'_2)$. Der Vergleich mit der intrinsischen Rate $1/\tau_1 = k'_1 + k'_{-1}$ zeigt, daß der Term $1/(1+K'_2)$ die Kopplung beinhaltet. Da K'_2 in der Größenordnung 10^{-3} und damit $K'_2 \ll 1$ ist, wird die P_2 – Relaxationsmode (2) kinetisch kontrolliert durch den Schritt $C \rightleftharpoons C_1$, d.h. es gilt $1/\tau_2 = 1/\tau'_1 = k'_1 + k'_{-1}$.

Der Schritt $C \rightleftharpoons C_1$ enthält feldinduzierte Reorientierungen der dipolaren Kopfgruppen der Lipide, dies kann anhand von molekulardynamischen Untersuchungen gezeigt werden [TIELEMAN et al., 2003]. Die Relaxationsrate spiegelt einen Mechanismus unter Einbeziehung permanenter Dipole wider. Für die Oberflächenbereiche der Zellen, in denen feldinduzierte Änderungen auftreten, gilt $K'_1 = [C_1]/[C] = k'_1/k'_{-1} \gg 1$. Damit ist $k'_1 \gg k'_{-1}$, was die Näherung $1/\tau_2 = k'_1$ rechtfertigt.

In dem Arrhenius – ähnlichen Ausdruck $k'_1 = (k'_1)^0 \cdot e^{x_1}$ für die Feldabhängigkeit des Ratenkoeffizienten k'_1 ist der Exponent x_1 spezifiziert als $x_1 = \Delta m_1 \cdot E_{\text{dir}}/k_B T$, wobei Δm_1 das mittlere Übergangsdipolmoment der Rotationsänderung der Kopfgruppen – Dipole und E_{dir} das gerichtete Feld nach Onsager [BÖTTCHER, 1973] sind. Mit $E_{\text{dir}} = \varepsilon_L \cdot E_m$ ergibt sich $E_{\text{dir}} = \varepsilon_L (\bar{a}_c/d_m) \cdot f_{\lambda,1} \cdot E_{\text{nom}}$.

Der geschwindigkeitsbestimmende Übergang $C \rightleftharpoons C_1$ enthält Zustände, die durch den (Leck-) Leitfähigkeitsterm $\lambda_{m,1}$, verbunden mit dem (Leck-) Faktor $f_{\lambda,1}$ (analog Gl. (IV.3)) charakterisiert werden. Für die Feldabhängigkeit von $1/\tau_2 = k'_1$ gilt

$$\frac{1}{\tau_2} = \left(\frac{1}{\tau_2^0} \right) \exp[b_1^* \cdot f_{\lambda,1} \cdot E_{\text{nom}}] \quad , \quad (\text{IV.31})$$

τ_2^0 bezieht sich hier auf $E_{\text{appl}} = 0$. Im Bereich $0 \leq E_{\text{appl}}/(\text{kV/cm}) \leq 1$ kann die Näherung $f_{\lambda,1} = 1$ verwendet werden. Mit $1/\tau_2 = k'_1$ ergibt sich $x_1 = b_1^* \cdot f_{\lambda,1} \cdot E_{\text{nom}}$ mit $b_1^* = \frac{\varepsilon_L \cdot \Delta m_1 \cdot \bar{a}_c}{k_B T \cdot d_m}$ und $\Delta m_1 = b_1^* \cdot k_B T \cdot d_m / (\varepsilon_L \cdot \bar{a}_c)$. Mit der Dielektrizitätskonstanten $\varepsilon_L = 2,3$ für Lipide ergibt die Näherung für geringe Feldstärken $1/\tau_2 = (1/\tau_2^0) \exp[b_1^* \cdot E_{\text{nom}}]$: $b_1^* = 2,3 (\pm 0,2) \text{ cm/kV}$ und $(1/\tau_2^0) = 10^3 \text{ s}^{-1}$. Das charakteristische Aktivierungsmoment ist $\Delta m_1 = 63 \cdot 10^{-30} \text{ Cm}$ (bzw. 19 Debye).

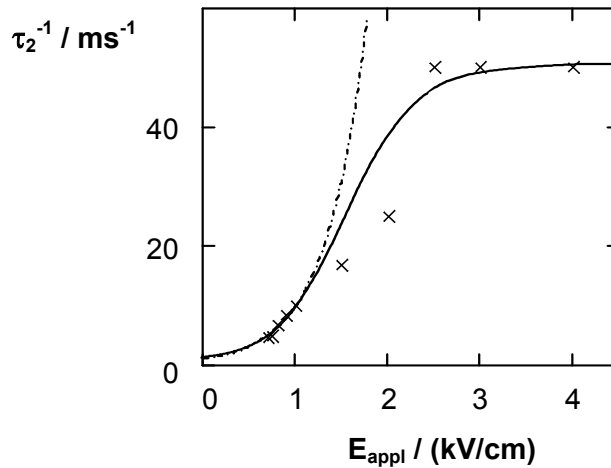


Abb. IV.4: Relaxationsrate τ_2^{-1} der elektroporativen Phase (2), als Funktion der Feldstärke E_{appl} ; die durchgezogene Linie zeigt die Datenanpassung im gesamten Feldstärkebereich mit dem Leitfähigkeitsterm $f_{\lambda,1}$ (vgl. Gl. (IV.31)).

Der Vollständigkeit halber sei angemerkt, daß das einfachere Schema $C \rightleftharpoons P_2$ charakterisiert wird durch $1/\tau_2 = k'_2 + k'_{-2} = k'_{-2}(1 + K'_2)$. Mit $K'_2 \ll 1$ erhält man $1/\tau_2 = k'_{-2}$, das würde bedeuten, daß der Rückwärtsschritt den feldgetriebenen Vorwärtsschritt steuert, was der physikalischen Erfahrung widerspricht. Die Feldabhängigkeit von $1/\tau_2$ macht damit die Annahme des Zwischenzustandes C_1 zur Beschreibung der gemessenen Leitfähigkeitsmode (2) notwendig.

Die langsame Normalmode (3)

Für die feldinduzierte Bildung der langlebigen P_3 – aus P_2 – Poren kann die Bildung der P_2 – Poren aus $C \rightleftharpoons C_1$ als schnell equilibriert aufgefaßt werden, während des langsamen Überganges $P_2 \rightleftharpoons P_3$. Die langsame Mode (3) läßt sich damit durch den (Gesamt-) Prozeß



beschreiben.

Das Geschwindigkeitsgesetz für die langsame Mode (3) in Schema (IV.32) lautet:

$$\frac{d[P_3]}{dt} = -k'_{-3}[P_3] + k'_{-3}[P_2] = -k'_{-3}\delta[P_3] + k'_{-3}\delta[P_2] \quad (\text{IV.33})$$

Die schnellen Equilibrierungen während dieser langsamen Mode beziehen sich auf die Mode (2)

mit $\delta[P_2] = K_2(\delta[C] + \delta[C_1]) = -K_2(\delta[P_2] + \delta[P_3])$, unter Verwendung des Massenerhaltes

$\delta[C] + \delta[C_1] + \delta[P_2] + \delta[P_3] = 0$. Damit ist $\delta[P_2] = -\delta[P_3] \cdot K_2/(1+K_2)$. Substitution in Gl. (IV.33) ergibt

$$\frac{d\delta[P_3]}{dt} = - \left(k'_{-3} + k'_{-3} \cdot \frac{K_2}{1+K_2} \right) \delta[P_3] = -\frac{1}{\tau_3} \delta[P_3] \quad (\text{IV.34})$$

Mit Gl. (IV.6) und Integration in den Grenzen $t = 0$ und t erhält man:

$$\frac{\delta[P_3]}{\delta[P_3^0]} = \frac{Y_3 - Y_3(t)}{Y_3} = 1 - \frac{t - \tau_2(1 - \exp[-t/\tau_2])}{\tau_3} \quad (\text{IV.35})$$

Die (Gesamt-) Gleichgewichtskonstante dieser Mode ist definiert als

$$K_3 = \frac{[P_3]}{[P_2] + [C] + [C_1]} = \frac{f_3}{1 - f_3} \quad (\text{IV.36})$$

Mit den Gln. (IV.19) und (IV.20) wird ersichtlich:

$$f_3 = \frac{[P_3]}{c_0} = \frac{K'_3 K'_2 K'_1}{1 + K'_1(1 + K'_2(1 + K'_3))} \quad , \quad K_3 = K'_3 \cdot \frac{K'_2 K'_1}{1 + K'_1(1 + K'_2)} \quad .$$

Aus der Analyse der Daten ergibt sich, daß $K'_1 \gg 1$ und $K_2 \ll 1$. Damit gelten die Näherungen

$K_3 = K'_3 \cdot K_2$ und $f_3 \approx K'_3 \cdot K_2$, sowie $K_3 \gg 1$.

Feldabhängigkeit der Amplitude f_3

Die Kinetik der Relaxationsmode $\Delta\lambda_3(t)$, welche die Membran-Leitfähigkeitsmode $\Delta\lambda_{m,3}$ wiedergibt, wird mit Hilfe von Gl. (IV.6) analysiert. Die strukturelle $f_3(t)$ -Relaxation in dem kurzen Zeitbereich $0 \leq t \ll \tau_3$ ist gegeben durch

$$\frac{f_3(t) - f_3^0}{(f_3 - f_3^0)} = \frac{Y_3(t)}{Y_3} = \frac{t - \tau_2(1 - \exp[-t/\tau_2])}{\tau_3} \quad (\text{IV.37})$$

Hier ist f_3 die Amplitude von $f_3(t)$ und f_3^0 der Anteil P_3 – Poren bei $E_{\text{appl}} = 0$. Die Feldstärkeabhängigkeiten von f_3 und K_3 sind verknüpft durch

$$\frac{f_3}{f_3^0} = \frac{K_3}{K_3^0} = \exp[b_{3,2}^0 \cdot f_{\lambda,3}^2 \cdot E_{\text{nom}}^2] \quad , \quad (\text{IV.38})$$

wobei $b_{3,2}^0$ die Volumenänderung $\Delta V_{3,2} = V_3 - V_2$ beinhaltet. Die Mode (3) beschreibt den Übergang $P_2 \rightarrow P_3$ mit dem zugehörigen Reaktionsmoment $\Delta_R M_{3,2}^\ominus = \Delta V_{3,2} \cdot \Delta_R P^\ominus$. Der mittlere Porenradius \bar{r}_3 wird berechnet aus $V_3 = V_2 + \Delta V_{3,2}$ als $\bar{r}_3 = (V_3 / \pi d_m)^{1/2}$. Aus dem Verhältnis $\Delta V_{3,2} > V_2$ wird ersichtlich, daß die Feldabhängigkeit von K_3 deutlich größer ist als die von K_2 . Damit sollte die Feldabhängigkeit der Relaxationsrate $1/\tau_3$ ebenfalls deutlich größer sein als die von $1/\tau_2$.

Relaxationsrate $1/\tau_3$

Die Relaxationsrate der Mode (3) ist gegeben als

$$1/\tau_3 = k'_{-3} + k'_3 \cdot K_2 / (1+K_2) \quad , \quad (\text{IV.39})$$

wobei die Kopplung des intrinsischen Überganges $P_2 \rightleftharpoons P_3$ (mit $1/\tau'_3 = k'_3 + k'_{-3}$) an die schnelleren Schritte $C \rightleftharpoons C_1 \rightleftharpoons P_2$ (equilibriert während des Poren – Überganges $P_2 \rightarrow P_3$) durch den Kopplungsfaktor $K_2 / (1+K_2) \approx K'_2$ ausgedrückt wird. Im Feldstärkebereich $0 \leq E/(\text{kV/cm}) \leq 0,9$ erlaubt die hier schwache Feldabhängigkeit von $K_3 = f_3$ die grobe Näherung $K_3 \approx K_3^0$. K_3 und $1/\tau_3$ weisen vergleichbare, stark nichtlineare Abhängigkeiten von E auf, wie K_2 und $1/\tau_2$. Analog zu $K_3 \approx K_3^0$ kann man annehmen, daß im Feldstärkebereich $0 \leq E/(\text{kV/cm}) \leq 0,9$ die Näherung $\tau_3 \approx \tau_3^0$ anwendbar ist.

Die experimentellen Daten zur Mode (3) beziehen sich lediglich auf den Zeitbereich $0 \leq t \leq t_E$, die Amplituden $Y_3 = m_3 \cdot \tau_3$ sind nicht direkt zugänglich. Analog zu Gl. (IV.37) erhält man also:

$$\frac{f_3(t_E) - f_3^0}{(f_3 - f_3^0)} = \frac{t_E - \tau_2 (1 - \exp[-t_E / \tau_2])}{\tau_3^0} \quad . \quad (\text{IV.40})$$

Parallele Bildung der Porenzustände

Werden – alternativ zu dem in Gl. (IV.11) beschriebenen Folgeprozeß – die Membranporenzustände parallel und unabhängig voneinander gebildet, d.h. $C \rightleftharpoons P_2$ und $C' \rightleftharpoons P_3$, mit $C_0 = ([C] + [P_2]) + ([C'] + [P_3])$, ist die totale Leitfähigkeitsänderung der Membran $\Delta\lambda_m = \Delta\lambda_m(\text{II}) + \Delta\lambda_m(\text{III})$ einfach die Summe der Beiträge $\Delta\lambda_m(\text{II}) = \Delta\lambda_{m,2}$ und $\Delta\lambda_m(\text{III}) = \Delta\lambda_{m,3}$. Die

individuellen Porenfraktionen sind jeweils definiert als $f'_{II} = [P_2] / ([C] + [P_2]) = f_2 / (1 - f'_{III})$ und $f'_{III} = [P_3] / ([C] + [P_3]) = f_3 / (1 - f'_{II})$. Weil f'_{II} nun f'_{III} enthält und umgekehrt, muß die Normalmoden-Datenanpassung iterativ erfolgen, beginnend mit der Näherung $f'_{II} = f_2 = [P_2] / [C_0]$. Im Rahmen des Fehlers erhält man $f'_{II} = f_2$ und $f'_{III} = f_3$. Damit ergeben das parallele und das konsekutive Modell die gleichen Werte für $\bar{f}_2, \bar{f}_3, b_1^*, b_{2,0}^0, b_{3,0}^0$.

Membranleitfähigkeit λ_m von Zellen im Pellet

Leitfähigkeit und Porenzustände

Analog zu reinen Lipidmembranen [GRIESE et al. (2002)] ist die Membranleitfähigkeit λ_m der Zellen im Pellet gegeben durch

$$\lambda_m = \sum_i f_i \cdot \lambda_{p,i} + \lambda_{m,1} \quad (IV.41)$$

Hinsichtlich der Summe aller Zustände $c_0 = ([P_2] + [P_3]) + ([C] + [C_1])$ sind die Terme $\lambda_{p,i}$ die (feldabhängigen) Leitfähigkeiten der Porenzustände P_2 und P_3 . Die Zustände C und C_1 enthalten möglicherweise Ionenkanalproteine und andere Leckstellen, die den parallelen Leitfähigkeitsbeitrag $\lambda_{m,1}$ hervorrufen. Für $E_{appl} = 0$ nimmt Gl. (IV.41) die Form

$$\lambda_m^0 = \sum_i f_i^0 \cdot \lambda_{p,i}^0 + \lambda_{m,1} \quad (IV.42)$$

an. Die gemessene Leitfähigkeit λ_0 bei $E_{appl} = 0$ bezieht sich auf die Membranleitfähigkeit λ_m^0 . Mit Gl. (IV.42) sind die feldinduzierten Relaxationen der Membranleitfähigkeiten

$$\lambda_{m,i} = \sum_i \Delta(f_i \cdot \lambda_{p,i}) + \lambda_m^0 \quad , \quad (IV.43)$$

welche die Änderungen $\sum_i \Delta(f_i \cdot \lambda_{p,i}) = \sum_i (f_i \cdot \lambda_{p,i} - f_i^0 \cdot \lambda_{p,i}^0)$ beinhalten; f_i^0 und $\lambda_{p,i}^0$ sind die Porenfraktion und die Leitfähigkeit des Porentyps i bei $E_{appl} = 0$. Analog zu den Leitfähigkeitsnormalmoden $\Delta\lambda_i = \lambda_i - \lambda_{i-1}$ in den Gln. (IV.8) gilt für die Moden der Membranleitfähigkeit

$$\Delta\lambda_{m,i} = \lambda_{m,i} - \lambda_{m,i-1} = \sum_i \Delta(f_i \cdot \lambda_{p,i}) \quad , \quad (IV.44)$$

wobei offensichtlich formal $\lambda_{m,1} = \lambda_m^0$ gilt. Die Moden $\Delta\lambda_2 = \lambda_2 - \lambda_0$ und $\Delta\lambda_3 = \lambda_3 - \lambda_2$ geben somit jeweils die Membranmoden

$$\Delta\lambda_{m,2} = \lambda_{m,2} - \lambda_m^0 = f_2 \lambda_{p,2} - f_2^0 \lambda_{p,2}^0 \quad (IV.45)$$

und

$$\Delta\lambda_{m,3} = \lambda_{m,3} - \lambda_{m,2} = f_3 \lambda_{p,3} - f_3^0 \lambda_{p,3}^0 \quad (IV.46)$$

wieder.

Substitution des Ausdrucks für λ_m^0 , Gl. (IV.42) in Gl. (IV.43) für $i = 2$ und $i = 3$ ergibt die integralen Membranleitfähigkeiten:

$$\lambda_{m,2} = f_2 \lambda_{p,2} + f_3^0 \lambda_{p,3}^0 + \lambda_{m,1} \quad , \quad \lambda_{m,3} = f_2 \lambda_{p,2} + f_3 \lambda_{p,3} + \lambda_{m,1} \quad . \quad (IV.47)$$

Berechnung von λ_m mit Hilfe der Maxwellgleichung

Die experimentell ermittelten Leitfähigkeiten λ'_i , hier λ_0 , λ'_2 und λ'_3 einer Suspension sphärischer Objekte lassen sich über die Maxwell-Gleichung [COLE, 1972] ausdrücken mit Hilfe der Äquivalentleitfähigkeiten $\lambda_{eq,i}$ für die Zellen und deren Volumenanteil f_z . Dieser Ansatz wird hier verwendet für die untersuchten Pellets dicht gepackter Zellen. Die Maxwellgleichung für den hier betrachteten Fall lautet

$$\frac{\lambda_{ex} - \lambda'_i}{2\lambda_{ex} - \lambda'_i} = f_z \cdot \frac{\lambda_{ex} - \lambda_{eq,i}}{2\lambda_{ex} - \lambda_{eq,i}} \quad , \quad (IV.48)$$

wobei sich der Volumenanteil f_z der Zellen aus den Daten in Abb. III.3 ergibt.

Die Äquivalentleitfähigkeit $\lambda_{eq,i}$ einer Kugel mit der Leitfähigkeit des Innenraumes λ_{in} und der Leitfähigkeit der Schale λ_m ist dann nach DÄNZER (1934) und FRICKE (1953)

$$\lambda_{eq,i} = \lambda_{m,i} \cdot \frac{2 \cdot (1 - v) \cdot \lambda_{m,i} + (1 + 2v) \cdot \lambda_{in}}{(2 + v) \cdot \lambda_{m,i} + (1 - v) \cdot \lambda_{in}} \quad , \quad (IV.49)$$

mit dem Volumenanteil des Zellinnenraumes $v = (\bar{a}_c - d_m)^3 / \bar{a}_c^3$ mit dem Radius $\bar{a}_c - d_m \approx \bar{a}_c$.

Wie bereits vorher besprochen, werden die Leitfähigkeitsdaten λ_i zunächst in die λ'_i – Werte überführt und dann zur Ermittlung der $\lambda_{eq,i}$ – Werte verwendet, aus denen dann die Membranleitfähigkeiten $\lambda_{m,i}$ erhalten werden können. Die Analyse der $\lambda_0(f_z)$ – Daten mit Hilfe von Gl. (IV.48) und Gl. (IV.49) ist in Abb. (III.3) dargestellt. Die Datenanpassung ergibt die Parameter $\lambda_m^0 = 0,32 (\pm 0,02)$ mS/cm und $\lambda_{ex} = 1,7$ mS/cm. Die Grundleitfähigkeit des Pellets beträgt $\lambda_0 = 0,09 \pm 0,02$ mS/cm und ist damit etwa dreimal kleiner als λ_m^0 und etwa zwanzigmal kleiner als λ_{ex} , konsistent mit einer sehr raumerfüllenden Packung der CHO – Zellen im Pellet zwischen den Elektroden.

Die Membranleitfähigkeitsmoden $\Delta\lambda_{m,i}$, vgl. Gln. (IV.45) und (IV.46), beinhalten die Porenfraktionen f_i und die Porenleitfähigkeiten $\lambda_{p,i}$. Die Feldabhängigkeiten von f_2 und f_3 lassen sich explizit ausdrücken in der Form

$$f_i - f_i^0 = f_i^0 \cdot (\exp[b_i^0 \cdot f_{\lambda,i}^2 \cdot E_{\text{nom}}^2] - 1) \quad . \quad (\text{IV.50})$$

Nach KAKORIN und NEUMANN (2002) erzeugen die elektrostatischen Wechselwirkungen der wandernden Ionen mit der Porenwand einer wässrigen Pore eine Potentialbarriere für die Passage der Ionen durch die Membranpore. Ein externes elektrisches Feld kann die Barriere verkleinern und somit die Porenleitfähigkeit $\lambda_{p,i}$ gegenüber der Leitfähigkeit ohne Feld $\lambda_{p,i}^0$ vergrößern. Für ein hohes induziertes Potential $|\Delta\varphi_{\text{ind}}| \gg 25 \text{ mV}$ ergibt sich die Porenleitfähigkeit [KAKORIN, NEUMANN, 2002]

$$\lambda_{p,i} = \frac{\lambda_{\text{ex}} + \lambda_{\text{in}}}{2} \exp[(\alpha_{p,i} \cdot n_i \cdot |\Delta\varphi_{\text{ind}}| - \varphi_{\text{im},i}^0) \frac{F}{RT}] \quad , \quad (\text{IV.51})$$

mit der Faradaykonstanten F und $\alpha_p = 1 - RT/(F \cdot \varphi_{\text{im},i}^0)$. $\lambda_{\text{ex}} = 0,17 \text{ mS/cm}$ und $\lambda_{\text{in}} = 5,0 \text{ mS/cm}$ sind die Leitfähigkeiten des extrazellulären und intrazellulären Mediums. Das intrinsische, durch die Bildkräfte hervorgerufene Potential der (Poren-) Barriere ist näherungsweise [PARSEGGIAN, 1975] $\varphi_{\text{im},i}^0 \approx RT \cdot d_m / (F \cdot \bar{r}_i)$. Der mittlere Porenradius \bar{r}_i wird ermittelt aus b_i^0 in $(f_i / f_i^0) = (K_i / K_i^0) \cdot \exp(b_i^0 \cdot f_{\lambda,i}^2 \cdot E_{\text{nom}}^2)$. Der geometrische Parameter $n = h / d_m$ für die trapezförmige Energiebarriere von Poren in Lipidvesikeln beträgt $n = 0,12$ [KAKORIN, NEUMANN, 2002], dieser Wert wird hier übernommen.

Einsetzen der Polkappennäherung $\Delta\varphi_{\text{ind}} = -\bar{a}_c \cdot f_{\lambda,i} \cdot E_{\text{nom}}$ (Gl. IV.3) in Gl. IV.51 ergibt

$$\lambda_{p,i} = \lambda_{p,i}^0 \cdot \exp[\alpha_{p,i} \cdot n \cdot \bar{a}_c \cdot f_{\lambda,i} \cdot E_{\text{nom}} \cdot (F/RT)] \quad , \quad (\text{IV.52})$$

$$\text{mit} \quad \lambda_{p,i}^0 = \frac{\lambda_{\text{ex}} + \lambda_{\text{in}}}{2} \exp\left[\frac{-\varphi_{\text{im},i}^0 \cdot F}{RT}\right].$$

Bei $T = 293 \text{ K}$ (20°C) ergibt sich für $\bar{r}_2 = 1,0 \text{ nm}$ $\varphi_{\text{im},2}^0 = 0,13 \text{ V}$ und damit $\lambda_{p,2}^0 = 0,017 \text{ mS/cm}$; für $\bar{r}_3 = 1,5 \text{ nm}$ erhält man $\varphi_{\text{im},3}^0 = 0,084 \text{ V}$ und damit $\lambda_{p,3}^0 = 0,1 \text{ mS/cm}$. Mit $c_i^0 = c_i / f_{\lambda,i} = \alpha_{p,i} \cdot n \cdot \bar{a}_c \cdot F / RT$ erhält man für $\bar{r}_2 = 1,0 \text{ nm}$ und $\alpha_{p,2} = 0,80$: $c_2^0 = 2,8 \text{ cm/kV}$. Für $\bar{r}_3 = 1,5 \text{ nm}$ und $\alpha_{p,3} = 0,69$ ergibt sich $c_3^0 = 2,4 \text{ cm/kV}$.

In Abb. IV.7 (d) ist ersichtlich, daß $\lambda_{p,2}$ und $\lambda_{p,3}$ bis $E_{\text{appl}} \approx 0,8$ stark ansteigen und dann in Sättigung gehen, konsistent mit der Nivellierung der Membranspannung U_m .

Setzt man die zuvor aufgestellten Beziehungen in Gl. (IV.43) ein, erhält man den allgemeinen Ausdruck für die Membranleitfähigkeitsmoden $\Delta\lambda_{m,i}$ (bezüglich der gemessenen Moden $\Delta\lambda_i$):

$$\Delta\lambda_{m,i} = f_i^0 \lambda_{p,i}^0 (\exp[b_i^0 f_{\lambda,i}^2 E_{\text{nom}}^2 + c_i^0 f_{\lambda,i} E_{\text{nom}}] - 1) \quad . \quad (\text{IV.53})$$

Die Datenanalyse beginnt mit der Anpassung der vereinfachten Funktion

$$\Delta\lambda_{m,i} = f_i^0 \lambda_{p,i}^0 (\exp[b_i^0 E_{\text{nom}}^2] - 1) \quad (\text{IV.54})$$

an die Daten im Feldstärkebereich $0 \leq E/(\text{kV/cm}) \leq 0,8$, wo die Näherung $f_{\lambda,i} = 1$ und die Ungleichung $E_{\text{nom}}^2 \gg c_i^0 E$ gelten. Damit ergeben sich vorläufige Werte für $f_i^0 \lambda_{p,i}^0$ und b_i^0 und für das Polarisationsvolumen V_i und daraus \bar{r}_i . Dieser Wert für \bar{r}_i wird verwendet, um den Feldparameter c_i^0 (für $f_{\lambda,i} = 1$) zu berechnen. Daraufhin wird c_i^0 in Gl. (IV.53) eingesetzt, die iterative Datenanpassung ergibt letztlich die Werte für b_i^0 , c_i^0 , $f_{\lambda,i}$, V_i und \bar{r}_i .

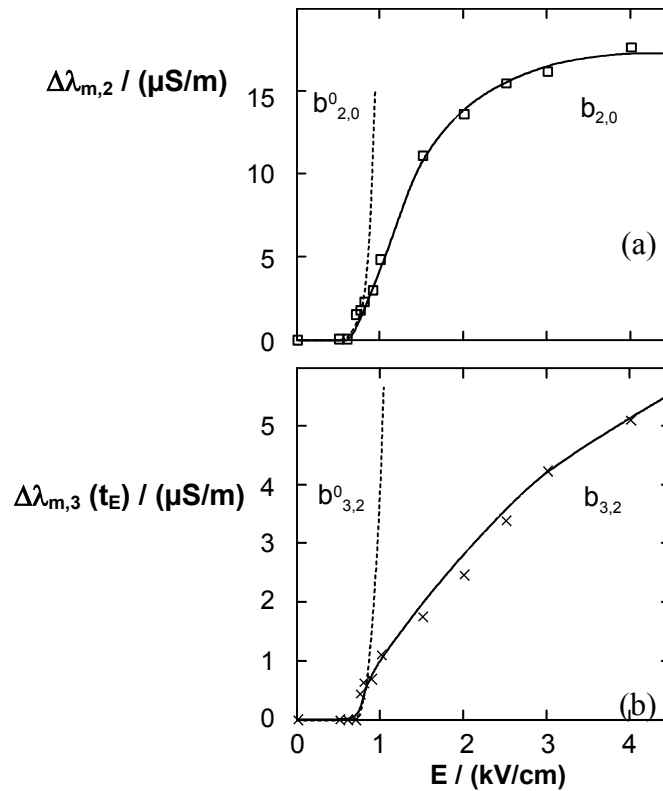


Abb. IV.5: Feldinduzierte Änderungen der Membranleitfähigkeit (a) $\Delta\lambda_{m,2}$, hervorgerufen durch die elektroporative Phase (2) mit $\Delta\lambda_2 = \lambda_0 \cdot (1+Y_2)$, (b) $\Delta\lambda_{m,3}(t_E)$ hervorgerufen durch die elektroporative Phase (3) mit $\Delta\lambda_3(t_E) = \lambda_0 \cdot (1+Y_3(t_E))$, zum Zeitpunkt t_E , jeweils als Funktion der Feldstärke E_{appl} . Die iterative Datenanpassung (gestrichelte Linien) gemäß Gl. (IV.53) und (IV.54) mit (a) $\lambda_{m,2}^0 = 2,4 \cdot 10^{-13} \text{ S/m}$ und (b) $\lambda_{m,3}^0 = 1,0 \cdot 10^{-13} \text{ S/m}$ ergibt $b_{2,0}^0 = 29 (\text{cm/kV})^2$ und $b_{3,2}^0 = 40 (\text{cm/kV})^2$. Für die Porenradien ergibt sich $\bar{r}_2 = 1,0(\pm 0,1) \text{ nm}$ und $\bar{r}_3 = 1,5(\pm 0,1) \text{ nm}$ für P_2 und P_3 . Die durchgezogenen Linien zeigen die Datenanpassung im gesamten Feldstärkebereich mit dem Leitfähigkeitsterm $f_{\lambda,i} = f_{\lambda,2} = f_{\lambda,3}$ in (a) und (b).

Zusammenstellung der charakteristischen Parameter der Mode (2)

Der Datensatz $\lambda_{m,2} / E$ wird verwendet, um die Feldabhängigkeit der Amplitude $\Delta\lambda_{m,2}$ der Relaxationsmode $\Delta\lambda_{m,2}(t)$ zu ermitteln. Aus der Datenanpassung ergeben sich die folgenden Parameter: $f_2^0 \lambda_2^0 = 2,4 \cdot 10^{-13} \text{ S/m}$, $b_2^0 = 29 \text{ (cm/kV)}^2$, $V_2^0 = 15,7 \text{ nm}^3$, $\bar{r}_2 = 1,0 (\pm 0,1) \text{ nm}$, $c_2^0 = 2,89 \text{ (cm/kV)}^2$, die Feldabhängigkeit von $f_{\lambda,i}(E)$ ist dargestellt in Abb. (IV.7 (a)). Aus der Leitfähigkeit $\lambda_{p,2}^0 = 0,017 \text{ mS/cm}$ der P_2 -Poren ergibt sich die P_2 -Porenfraktion in Abwesenheit des äußeren elektrischen Feldes $f_2^0 = 1,4 \cdot 10^{-10}$. Mit Hilfe von Gl. (IV.50) erhält man damit die Feldabhängigkeit der Amplitude f_2 (vgl. Abb. (IV.7 (b))).

Zusammenstellung der charakteristischen Parameter der Mode (3)

Die Auswertung der Normalmode 3 beschränkt sich auf den Zeitbereich $0 \leq t \leq t_E = 1 \text{ ms}$. Die langsame Nachfeld-Relaxation (bei $E = 0$) ist konsistent mit der Ausheilung der langlebigen P_3 -Poren, damit ist näherungsweise $\tau_R = \tau_3^0$. Die Relaxationsmode $\Delta\lambda_{m,3}$ erhält man aus dem Datensatz $\lambda_{m,3} / E$. Die Datenanpassung in Abb. (IV.5) mit Hilfe von Gl. (IV.53) und Gl. (IV.54) und $f_{\lambda,3}(E)$ aus $\Delta\lambda_{m,2}$ ergibt: $f_3^0 \lambda_3^0 = 1,0 \cdot 10^{-13} \text{ S/m}$, $b_{3,2}^0 = 40 \text{ (cm/kV)}^2$, $\Delta V_{3,2} = 35,3 \text{ nm}^3$ und damit $\bar{r}_3 = 1,5 (\pm 0,1) \text{ nm}$. Außerdem ergibt sich aus $\lambda_{p,3}^0 = 0,1 \text{ mS/cm}$ die Porenfraktion $f_3^0 = 10^{-11}$. Die Porenfraktion $f_3(t_E)$ am Ende des applizierten Feldpulses erhält man aus Gl. (IV.40), vgl. Abb. (IV.7 (b)). Einsetzen von $\sum_i f_i^0 \lambda_{p,i}^0 = f_2^0 \lambda_{p,2}^0 + f_3^0 \lambda_{p,3}^0 = 3,4 \cdot 10^{-7} \mu\text{S/m}$ in Gl. (IV.42) mit $\lambda_m^0 = 3,2 \mu\text{S/m}$ macht deutlich, daß $\lambda_m^0 = \lambda_{m,1} + \sum_i f_i^0 \lambda_{p,i}^0$ praktisch dem Leck-Beitrag $\lambda_{m,i}$ entspricht. Erwartungsgemäß sind die Anteile porierter Fläche f_2^0 und f_3^0 bei $E = 0$ sehr klein.

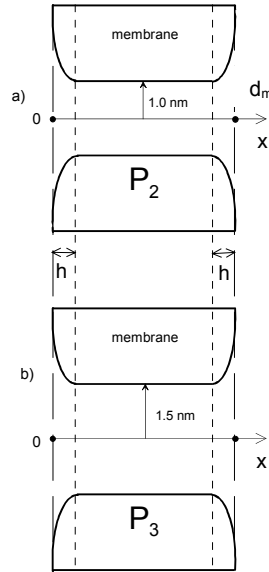


Abb. IV.6: Theoretische Modelle für die Porenzustände P₂ (a) und P₃ (b). Der Eingangs-Parameter ist $n = h / d_m = 0,12$, die Membrandicke $d_m = 5 \text{ nm}$ und die jeweiligen Porenradien sind $\bar{r}_2 = 1,0 \text{ nm}$ (P₂-Poren) und $\bar{r}_3 = 1,5 \text{ nm}$ (P₃-Poren).

Leitfähigkeitsfaktor f_λ und Membranspannung U_m

Aufgrund der endlichen Leitfähigkeit der Membran hängt das induzierte Membranfeld E_m nicht linear vom applizierten Feld E_{appl} ab. Die Feldabhängigkeit von $1/\tau_2$ ergibt $f_{\lambda,1}(E)$ des Überganges $C \rightleftharpoons C_1$, die Feldabhängigkeit von $\Delta\lambda_{m,2}$ ergibt $f_{\lambda,2}(E)$ (vgl. Abb. (IV.5) und (IV.7)).

Die Membranspannung $U_m = E_m \cdot d_m = E_{\text{nom}} \cdot \bar{a}_c \cdot f_\lambda$ sinkt mit abnehmendem f_λ . Der Leitfähigkeitsterm $f_{\lambda,2} = f_{\lambda,3}$ beinhaltet den (geringen) Beitrag von $f_{\lambda,1}$. Aufgrund des elektroporativen Anstiegs von λ_m übersteigt die Membranspannung nicht $U_m = 0,55 \text{ V}$, was einer Membranfeldstärke von $E \leq 1,1 \text{ MV/cm}$ entspricht.

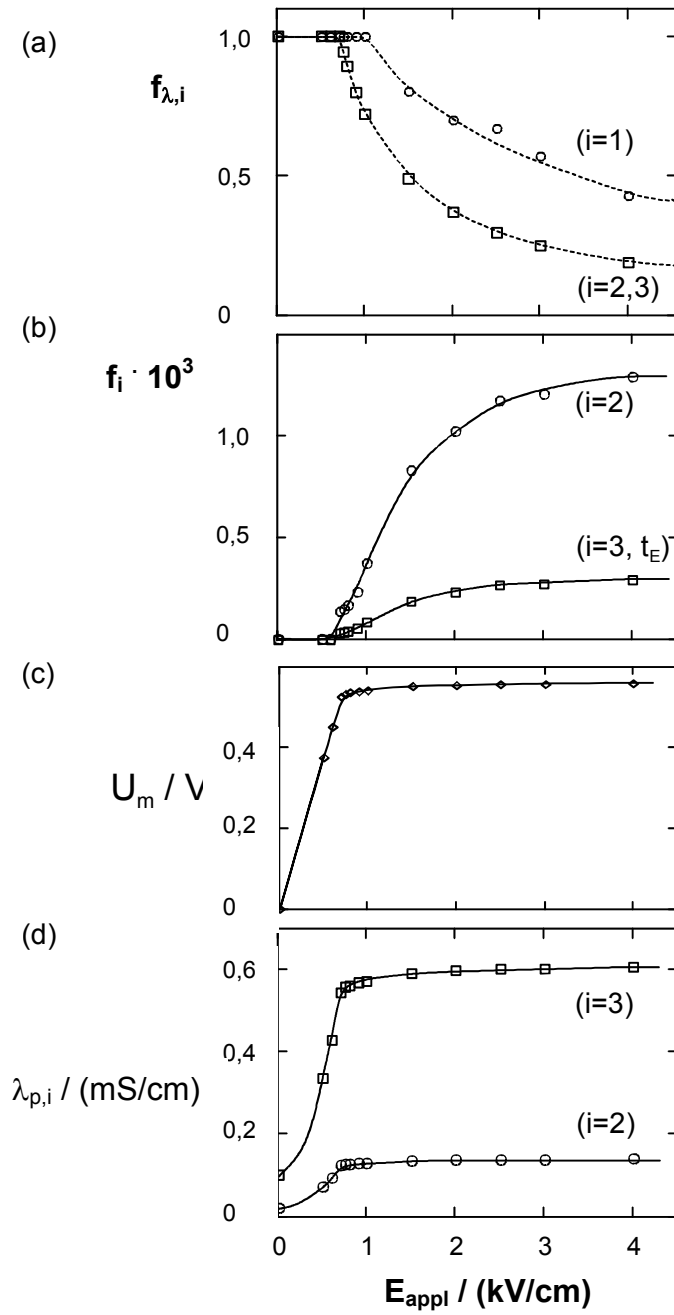


Abb. IV.7: Feldstärkeabhängigkeit der charakteristischen Membrangrößen: (a) Leitfähigkeitsterme $f_{\lambda,i}$ der Elektroporationsschritte ($i = 1$) und ($i = 2,3$); (b) Bruchteile der (Membran-) Elektroporen f_2 der Phase (2) und $f_3(t_E)$ der Phase (3) bei $t = t_E$; (c) induzierte Membranspannung $U_m = a_c E f_{\lambda,2,3}$ und (d) Porenleitfähigkeit $\lambda_{p,i} = \lambda_{p,i}^0 \cdot \exp[c_i^0 \cdot E \cdot f_{\lambda,i}]$, berechnet für $n = 0,12$ und den Porenradius $\bar{r}_2 = 1,0 (\pm 0,1) \text{ nm}$ ($\lambda_{p,2}$) und für $\bar{r}_3 = 1,5 (\pm 0,1) \text{ nm}$ ($\lambda_{p,3}$). Die Symbole (\square , \circ) beziehen sich auf die Datenpunkte für $f_{\lambda,i} = f_{\lambda,2} = f_{\lambda,3}$ in (a), (b) und (d).

Alternative Deutungen der Leitfähigkeitsrelaxationen

Elektroelongation der Zellen bei Volumenabnahme (Hagen-Poiseuille-Gleichung)

Die Relaxationsphase (3) könnte alternativ zur Bildung des Porenzustandes P_3 lediglich hervorgerufen sein durch den Austritt von Elektrolyt durch die Membranporen. Dann läßt sich die damit verbundene Volumenabnahme $\Delta V/V_0$ aus dem Leitfähigkeitsterm berechnen.

Beispielsweise ist bei $E_{\text{appl}} = 1,5 \text{ kV/cm}$ $Y_3(t_E) = \Delta\lambda_3(t_E) / \lambda_0 = 0,2$ bzw. $Y^{\text{off}} = 0,2$ bei $t = 0$ auf der Nachfeld-Zeitskala. Unter Verwendung der Hagen-Poiseuille-Gleichung [KAKORIN et al., 1998] für $E_{\text{nom}} \approx E_{\text{appl}} = 1,5 \text{ kV/cm}$ mit $f_2 = 8,3 \cdot 10^{-4}$, $\bar{r}_2 = 1,0 \text{ nm}$, $f_3 = 3,0 \cdot 10^{-5}$, $\bar{r}_3 = 1,5 \text{ nm}$, $\Delta t = t_E = 1 \text{ ms}$ und $V_0 = 4/3 \cdot p \cdot \bar{a}_c^3$, ergibt sich

$$\frac{\Delta V}{V_0} = -\frac{9}{160} \cdot \frac{\epsilon_0 \cdot \epsilon_w \cdot E_{\text{nom}}^2 \cdot (f_2 \cdot \bar{r}_2^2 + f_3 \cdot \bar{r}_3^2)}{d \cdot \eta \cdot \bar{a}_c} \cdot \Delta t = -2,1 \cdot 10^{-8} \quad , \quad (\text{IV.55})$$

mit der Viskosität von Wasser $\eta = 1,002 \cdot 10^{-3} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bei $T = 293 \text{ K}$ (20°C). Damit ist der aus Y_2 und Y_3 berechnete Wert $\Delta V / V_0 = -((\Delta\lambda_2 + \Delta\lambda_3(t_E)) / \lambda_0) / \varsigma = -0,015$ viel größer als der „theoretische“ Wert $\Delta V / V_0 = -2,1 \cdot 10^{-8}$ aus Gl. (IV.55). $\varsigma = \lambda_{\text{max}} / \lambda_0 = 55$ ist der Faktor für maximalen Elektrolytaustritt aus den Zellen ($\lambda_0 = 0,09 \text{ mS/cm}$). Der relative Leitfähigkeitswert $Y^{\text{off}}(t \rightarrow 0) \approx \Delta\lambda_3(t_E) / \lambda_0 = 0,2$ würde also eine Volumenänderung $\Delta V / V_0 = -\Delta\lambda_3(t_E) / (\lambda_0 \cdot \varsigma)$ erfordern, welche viel größer ist als $-2,1 \cdot 10^{-8}$.

Damit kann der Elektrolytaustritt nur einen vernachlässigbar geringen Anteil an den Leitfähigkeitsmoden während der Feldpulsapplikation haben.

Elongation der Zellen durch Maxwellstreß

Es ist bekannt, daß der auf die Zellen wirkende elektrische Maxwellstreß eine Elongation der Zellen in Richtung des elektrischen Feldvektors verursacht. Da die CHO-Zellen in der Gesamtheit weniger leitfähig sind als das umgebende Medium, sollte eine Elongation der Zellkörper mit einer Leitwerterhöhung des Pellets aufgrund der Erhöhung des für den Ionenstrom zur Verfügung stehenden Querschnitts einhergehen.

Die feldinduzierte Elongation der Zellen führt zu einer Verringerung des Membran-Membran-Abstands in Feldrichtung. Der Pelletleitwert $\Lambda = \lambda \cdot A / l_n$ ist proportional zum geometrischen Querschnitt A für den Ionenstrom.

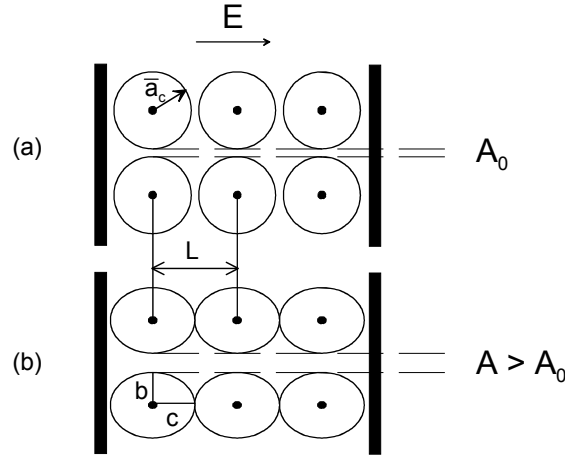


Abb. IV.8: Modell für den relativen Anstieg $\Delta A/A_0$ des Querschnitts A für den Ionenstrom entlang der Feldlinien, aufgrund elektroporativer Elongation der Zellen im Pellet; (a) Zellen ($\bar{a}_c = 7,5 \mu\text{m}$) in Abwesenheit des elektrischen Feldes und (b) elongierte Zellen im elektrischen Feld E , die Elongation bedingt eine Erhöhung $\Delta A = A - A_0$ des Querschnitts für den Ionenstrom von A_0 bei $E = 0$ auf A bei $E > 0$. Bei RCF = 90 g ist der mittlere Abstand zwischen den Zellmittelpunkten $L = 16 \mu\text{m}$.

Wenn der relative Anstieg der Pelletleitfähigkeit $(\Delta\lambda_2 + \Delta\lambda_3) / \lambda_0 = \Delta\Lambda / \Lambda_0 = (\Lambda - \Lambda_0) / \Lambda_0$ hervorgerufen wird durch die Verformung der Zellen, ist er proportional zur Erhöhung des Querschnitts $\Delta A / A_0 = (A - A_0) / A_0$ in Richtung der Zellelongation, wobei Λ und Λ_0 die Leitwerte in An- und Abwesenheit des elektrischen Feldes sind. Explizit gilt also

$$\frac{\Delta\lambda}{\lambda_0} = \frac{\Delta\lambda_3 + \Delta\lambda_2}{\lambda_0} = \frac{\Delta A}{A_0} \quad , \quad (\text{IV.56})$$

wobei $A_0 = L^2 - \pi \bar{a}_c^2$ der ursprüngliche und $A = L^2 - \pi b^2$ der durch die Elongation erhöhte Querschnitt sind. Die Zellen sind bei $f_z = 0,6$ ($< 0,74$) im Mittel nicht in engem Kontakt, so daß bereits ein begrenzter Ionenstrom möglich ist. Der mittlere Abstand zwischen den Zellmittelpunkten wird aus der Dichte $\rho = N / V$ bezüglich $L = 1 / \rho^{1/3} = 16 \mu\text{m}$ für $f_z = 0,6$, $\rho = 2,4 \cdot 10^8 \text{ cm}^{-3}$ berechnet. Die Länge der Halbachse b beträgt für $(\Delta\lambda_3(t_E) + \Delta\lambda_2) / \lambda_0 = (0,2 + 0,6) = 0,8$ bei $E_{\text{appl}} = 1,5 \text{ kV/cm}$ und $t_E = 1 \text{ ms}$

$$b = \sqrt{\bar{a}_c^2 - \Delta\lambda / \lambda_0 \cdot (L^2 - \pi \bar{a}_c^2) / \pi} = 5,9 \mu\text{m} \quad . \quad (\text{IV.57})$$

Der Elongationsgrad entspricht dem Verhältnis der Halbachsen des Ellipsoids $p_s = c / b = 1,87$, berechnet aus

$$b = \bar{a}_c \cdot \sqrt[3]{\frac{1 + \Delta V(p_s) / V_0}{p_s}} \quad , \quad (\text{IV.58})$$

wobei $\Delta V/V_0$ nach KAKORIN et al., 1998 bzw. GRIESE et al., 2002 gegeben ist durch

$$\frac{\Delta V}{V_0} = \left(\frac{\arcsin \sqrt{1-p_s^2}}{2 \cdot \sqrt{p_s^2-1}} + \frac{p_s^2}{2} \right)^{-2/3} \cdot p_s^2 - 1 = -0.088 . \quad (\text{IV.59})$$

Dieser Wert ist etwa sechsmal größer als der „experimentell“ zu rechtfertigende Wert $\Delta V / V_0 = -((\Delta \lambda_2 + \Delta \lambda_3(t_E))/\lambda_0)/\zeta = -0,015$ (s.o.). Damit kann mit einer Elongation der Zellen der Leitfähigkeitsanstieg in den Moden (2) und (3) ebenfalls nicht gedeutet werden. Für die längere Halbachse erhält man aus $p_s = c_s / b = 1,87$:

$$c_s = p_s \cdot b = \bar{a}_c \sqrt{2 / (p_s^2 + \arcsin(\sqrt{1-p_s^2}) / \sqrt{p_s^2-1})} = 11 \mu\text{m} . \quad (\text{IV.60})$$

Der Abstand $L = 16 \mu\text{m}$ reicht nicht aus, um eine Verlängerung der Hauptachse auf $2 c_s = 22 \mu\text{m} > L$ zu ermöglichen. Auch mit einer Elongation der Zellen bei konstanter Oberfläche läßt sich der experimentell ermittelte Leitfähigkeitsanstieg also nicht erklären.

Bleibt alternativ das Zellvolumen konstant, benötigt man für die relative Leitfähigkeitsänderung $\Delta \lambda / \lambda_0 = 0,8$ die relative Oberflächenvergrößerung $\Delta S / S_0$ [GRIESE et al., 2002]:

$$\frac{\Delta S}{S_0} = \frac{p_v^{-2/3}}{2} + \frac{p_v^{1/3} \cdot \arcsin(\sqrt{1-p_v^2})}{2 \cdot \sqrt{1-p_v^2}} - 1 = 0,082 , \quad (\text{IV.61})$$

mit $p_v = c_v / b = 2,05$, $c_v = \bar{a}_c^3 / b^2 = 12,1 \mu\text{m}$ und $b = 5,9 \mu\text{m}$ (s. Gl. (IV.58)). Die relative Vergrößerung der Membranoberfläche durch Elektroporen ist bei $E_{\text{appl}} = 1,5 \text{ kV/cm}$ und $t = t_E$ $f_2 + f_3 = 8,6 \cdot 10^{-4} \ll 0,082$. Außerdem ergibt sich die längere Achse mit $2 c_v = 24,2 \mu\text{m}$, was viel größer als der zur Verfügung stehende Abstand $L = 16 \mu\text{m}$ ist. Damit kann auch die Elongation der Zellen bei konstantem Volumen nicht die Ursache der Leitfähigkeitsphasen (2) und (3) sein. Nimmt man alternativ an, daß nur die Leitfähigkeitsphase (3) durch Zellelongation hervorgerufen wird, auf Kosten der Oberflächenerhöhung durch die Bildung von Membranporen in Phase (2), ergibt sich für die kurze Halbachse

$$b_3 = \sqrt{\bar{a}_c^2 - \Delta \lambda_3 / \lambda_0 \cdot (L^2 - \pi \cdot \bar{a}_c^2) / \pi} = 7,1 \mu\text{m} . \quad (\text{IV.62})$$

Mit $c_v = \bar{a}_c^3 / b_3^2 = 8,3 \mu\text{m}$ ergibt sich $p_v = c_v / b_3 = 1,16$ und $\Delta S / S_0 = 3,7 \cdot 10^{-3}$. Auch hier ist $\Delta S / S_0 = 3,7 \cdot 10^{-3} > f_2 = 8,3 \cdot 10^{-4}$ (bei $E = 1,5 \text{ kV/cm}$ und $t = t_E$).

Obwohl $2c_v = 16,6 \mu\text{m} \geq L = 16 \mu\text{m}$, kann aufgrund von $\Delta S / S_0 > f_2$ (Faktor 5) die Leitfähigkeitsphase (3) nicht mit der Elongation der Zellen gedeutet werden.

Die Verformung der Zellen im elektrischen Feld kann also weder bei konstanter Membranfläche noch bei konstantem Zellvolumen die Ursache der Einfeld-Leitfähigkeitsrelaxationen sein.

Sehr große Poren

Bei Erythrozyten-Ghosts [CHANG, 1992], planaren Lipiddoppelschichten [ABIDOR et al., 1979; WINTERHALTER et al., 1996] und großen Lipidvesikeln [TEKLE et al., 2001] wurde die Bildung großer Membranporen beobachtet, die schließlich zum Zerreißen der Planarmembran und zur Fragmentierung der großen unter Bildung kleinerer Vesikel führte. Prinzipiell könnte man die Relaxationsphase (3) und die Nachfeldrelaxation $Y^{\text{off}}(t)$ ebenfalls mit der Expansion einiger weniger P_2 -Poren unter Bildung einer oder mehrerer langlebiger großer Poren beschreiben.

Approximiert man den linearen Teil des relativen Leitfähigkeitsanstiegs mit der Hagen-Poiseuille-Gleichung, lassen sich der Oberflächenanteil und der Radius r_p einer einzelnen Pore berechnen. Mit $\Delta V/V_0 = -Y_3(t_E)/\zeta$ erhält man für $E_{\text{appl}} = 1,5 \text{ kV/cm}$ und $Y_3(t_E) = m_3 t_E = 0,2$: $f_3(t_E) = 7,5 (\pm 0,5) \cdot 10^{-4}$ und $r_p = 410 (\pm 50) \text{ nm}$. Eine solche langlebige Pore ($\tau_R = 45 \text{ s}$) kann den Elektrolytefflux aus der Zelle während der Feldpuls-Phase (3) und nach dem Puls ($Y^{\text{off}}(t)$) zulassen. Der überwiegende Anteil der P_2 -Poren schließt sich innerhalb weniger Millisekunden nach Abschalten des elektrischen Feldes, d.h. bei $t \geq t_E$ und geht damit wieder in die Zustände C und C_1 über. Der Nachfeld-Leitfähigkeitsanstieg $Y^{\text{off}}(t)$ beginnt exakt am Endwert $Y_3(t_E)$. Beschreiben diese Prozesse den Ionenefflux durch eine große Pore, muß diese innerhalb der Relaxationszeit τ_2 der P_2 -Poren vollständig ausgebildet worden sein, um durch kontinuierlichen Efflux unter Maxwell-Streß den verzögerten linearen Anstieg in $Y_3(t)$ zu ermöglichen. Die Zeitkonstante $\tau_2^0 = 1 \text{ ms}$ ist um vier Größenordnungen kleiner als $\tau_R = 45 \text{ s}$, wobei τ_R dann die Zeitkonstante der Ausheilung der großen Pore ist.

Aufgrund der deutlich unterschiedlichen Kinetik ist es unwahrscheinlich, daß eine große Pore den langlebigen Porenzustand P_3 ausmacht.

(2.2) Nachfeld - Leitfähigkeitsänderungen

Anhand von Untersuchungen des einfachen Modellsystems salzgefüllter Vesikel im elektrischen Feld konnten KAKORIN et al. 1998 zeigen, daß die Leitfähigkeitsänderungen im Nach-Feld sich durch

$$Y^{\text{off}}(t) = Y^{\text{off}} \left(1 - \exp[-(k_f(t_E) \cdot \tau_R)(1 - e^{-t/\tau_R})] \right) \quad (\text{IV.63})$$

beschreiben lassen.

Für CHO-Pellets liefert die Datenanalyse nach Gl. (IV.63) die feldstärkeunabhängige Porenausheilzeit

$$\tau_R = 1/k_R = 45 \pm 3 \text{ s.}$$

Der Effluxkoeffizient k_f hingegen steigt mit steigender Feldstärke.

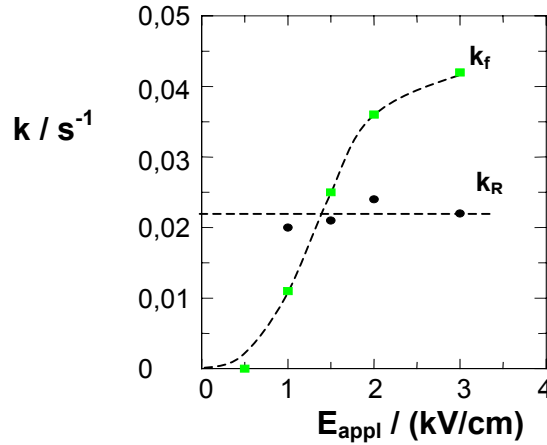


Abb. IV.9: Analyse der Leitfähigkeitsänderungen *nach* Feldpulsapplikation an CHO-Zell-Pellets in 290 mM Sucrose als Funktion der Feldstärke $E_{\text{appl}} = U_{\text{appl}} / l_n$ gemäß $Y^{\text{off}}(t) = Y^{\text{off}} \left(1 - \exp[-(k_f(t_E) \cdot \tau_R)(1 - e^{-t/\tau_R})] \right)$, k_f ist der Effluxkoeffizient, $k_R = 1/\tau_R$ der Porenausheilkoeffizient.

Der Effluxkoeffizient k_f ergibt sich aus dem Permeabilitätskoeffizienten P_p , der Porenfläche S_p und dem Innenvolumen V^{in} der Zellen als

$$k_f = \frac{P_p \cdot S_p}{V^{\text{in}}} \quad . \quad (\text{IV.64})$$

Damit ist k_f proportional zur porierten Fläche, was konsistent mit der dargestellten Feldstärkeabhängigkeit ist. Die porierte Fläche nimmt oberhalb einer zur Porenbildung notwendigen Minimalfeldstärke mit der Feldstärke zu und geht schließlich für große externe Feldstärken in Sättigung.

(2.3) Einfluß der Medienzusammensetzung auf Leitfähigkeitsänderungen im Ein- und Ausfeld

Die relativen Leitfähigkeitsänderungen nach Feldpulsapplikation an CHO-Zell-Pellets in iso-osmolaren Sucrose – PBS – Lösungen nehmen mit zunehmendem Elektrolytanteil ab. Bei $[\text{NaCl}] \geq 100 \text{ mM}$ werden die Änderungen sogar negativ.

In Medien geringer Ionenstärke wird die Leitfähigkeit des extrazellulären Mediums durch den Austritt von Elektrolyt aus den Zellen stark erhöht. Weiterhin ist die Diffusion von Sucrose durch die Membranporen in die Zelle wesentlich langsamer als die kleiner Ionen aus der Zelle heraus, was zu einem - zumindest vorübergehenden - Schrumpfen der Zellen führen kann [KINOSITA et al. 1977, FERRET et al., 2000]. Die Elektroporation in Gegenwart von Natriumionen führt dazu, daß diese begleitet von Wasser und Chloridionen durch die Membranporen in die Zellen diffundieren. Da die Diffusion von Natriumionen in die Zellen schneller ist als die von Kaliumionen aus den Zellen, ist eine kolloidosmotische Zellschwellung zu erwarten, welche wiederum zu einer Reduktion des extrazellulären Volumens und damit zu einer Abnahme des Leitwertes führt.

Die Leitfähigkeitsänderungen im Nachfeldbereich werden also bedingt durch eine Überlagerung von zwei Effekten, der Diffusion von Ionen durch die Membranporen in die bzw. aus der Zelle und der Änderung des Zellvolumens durch kolloidosmotische Effekte.

Die einzelnen Parameter der Einfeld-Leitfähigkeitsänderung variieren ebenfalls mit der Zusammensetzung des interstitiellen Mediums:

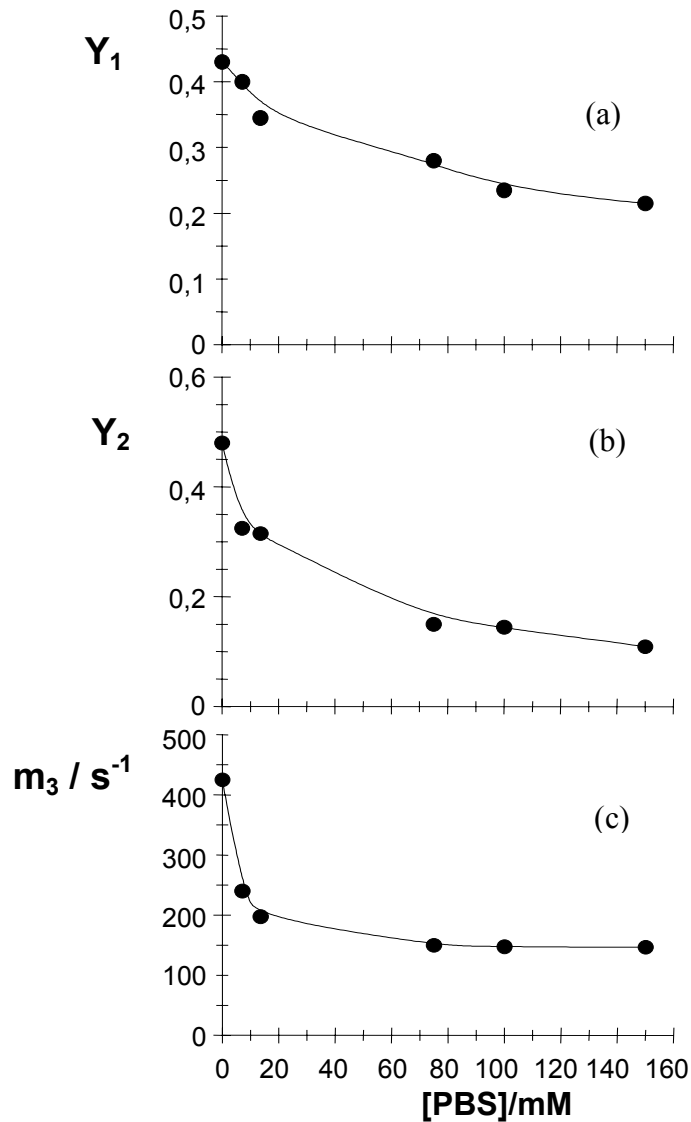


Abb. IV.10: Amplituden Y_i mit $i = 1$ und $i = 2$ und Steigung $m_3 = Y_3/\tau_3$ der Leitfähigkeitsänderungen während Feldpulsapplikation ($E_{appl} = 1,5 \text{ kV/cm}$, $t_E = 1,0 \text{ ms}$) an CHO-Pellets in Mischungen aus PBS-Puffer und Sucrose (290 mM) in Abhängigkeit von der Salz-Konzentration im PBS-Puffer.

Die Abhängigkeit von Y_1 von der Ionenkonzentration des interstitiellen Mediums (Abb. IV.10 (a)) ist wiederum mit einem Felddissoziationseffekt konsistent. Ein analoges Verhalten beobachteten MÜLLER et al. (1989) für DNA im elektrischen Feld.

(2.4) Temperaturabhängigkeiten von Poren - Bildung und –Ausheilung

Die vorausgegangenen Berachtungen beziehen sich auf die Temperatur $T = 293 \text{ K}$ (20°C).

Die Zeitkonstanten des exponentiellen Leitfähigkeitsanstiegs im Einfeld-Bereich τ_2 , sowie der P_3 -Poren-Ausheilung τ_R (ermittelt aus den Nachfeld-Leitfähigkeitsdaten) werden mit steigender

Temperatur kleiner. Das gleiche gilt für den aus den Nachfeld-Leitfähigkeitsdaten ermittelten Effluxkoeffizienten $1/k_f = \tau_f$. Die Geschwindigkeiten von Porenbildung und –Ausheilung nehmen also mit Erhöhung der Temperatur zu. Eine Erhöhung der Temperatur hat eine Erhöhung der Membranfluidität zur Folge, die Lipidmoleküle an den Porenrändern werden beweglicher. Diese temperaturbedingte Erhöhung der Mobilität führt zu einer Erleichterung und damit Beschleunigung struktureller Änderungen. Weiterhin erhöht sich mit der Temperatur aber auch die Ionenbeweglichkeit im intrazellulären und interstitiellen Medium.

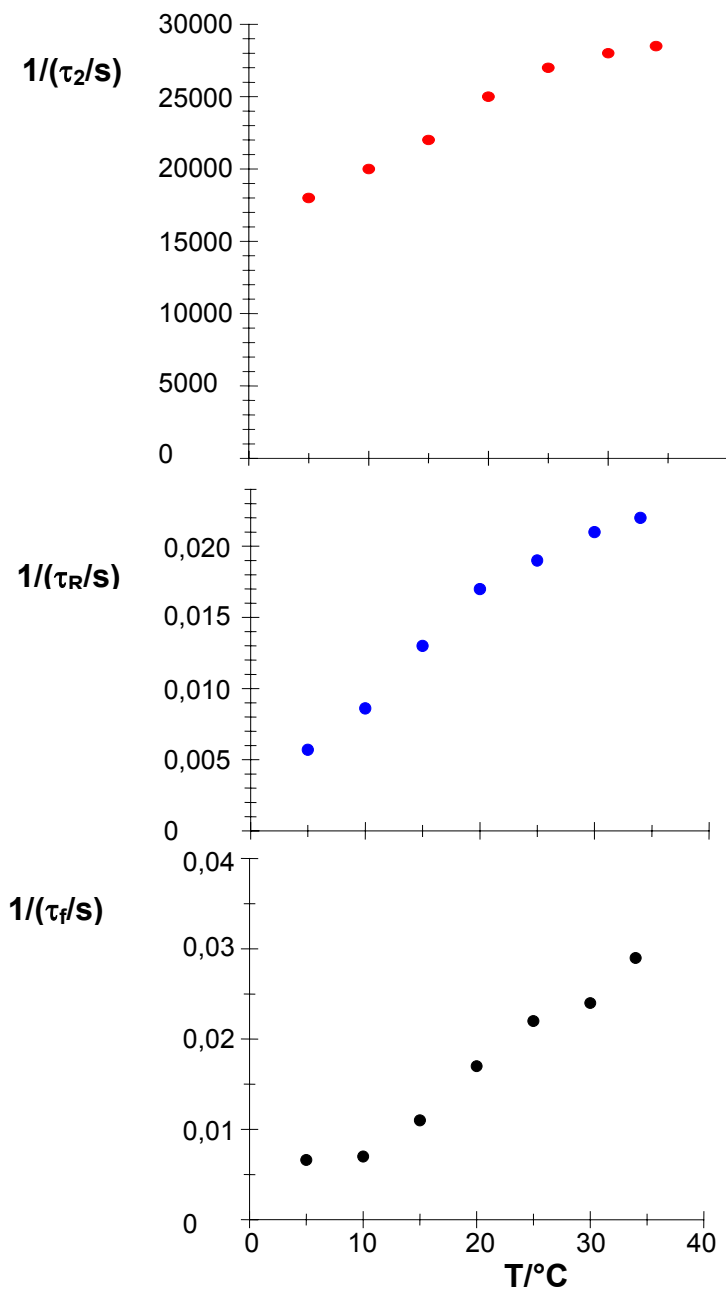


Abb. IV.11: Temperaturabhängigkeiten der Zeitkonstanten der Porenbildung (τ_2), der Porenausheilung (τ_R) und des Effluxkoeffizienten (τ_f) nach Feldpulsapplikation der Feldstärke $E_{\text{appl}} = 1,5 \text{ kV/cm}$ und der Pulsdauer $t_E = 1 \text{ ms}$ an CHO-Pellets in 290 mM Sucrose; $l_n = 1 \text{ mm}$.

Die Auswertung der Temperaturabhängigkeiten der Zeitkonstanten für Porenbildung und Porenausheilung nach Arrhenius

$$k_i = k_{i,0} e^{-E_a / RT} \quad (\text{IV.65})$$

liefert im betrachteten Temperaturbereich jeweils zwei Bereiche, für die sich unterschiedliche Aktivierungsenergien $E_{a,i1}$ und $E_{a,i2}$ ergeben.

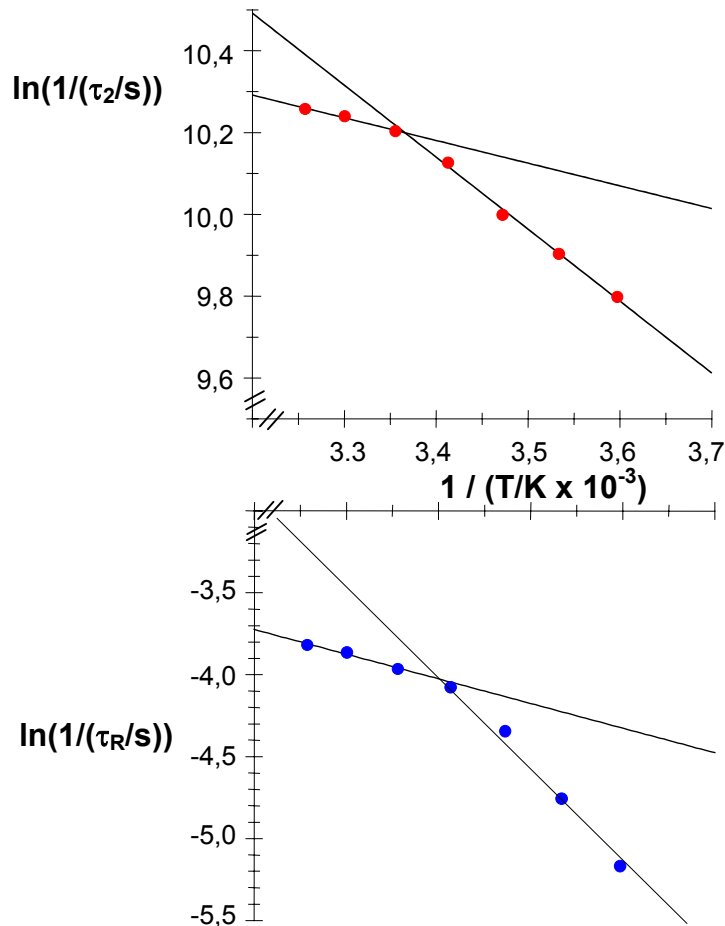


Abb. IV.12: Temperaturabhängigkeiten der Zeitkonstanten der Porenbildung (τ_2) und der Porenausheilung (τ_R) nach Feldpulsapplikation der Feldstärke $E_{\text{appl}} = 1,5$ kV/cm und der Pulsdauer $t_E = 1$ ms an CHO-Pellets in 290 mM Sucrose; $l_n = 1$ mm; Auftragung nach Arrhenius.

$$E_{a,P,1} = 4,6 \text{ kJ/mol für } T > 293 \text{ K}$$

$$E_{a,P,2} = 14,6 \text{ kJ/mol für } T \leq 293 \text{ K}$$

$$E_{a,R,1} = 12,9 \text{ kJ/mol für } T > 293 \text{ K}$$

$$E_{a,R,2} = 45,0 \text{ kJ/mol für } T \leq 293 \text{ K}$$

Die weitgehende Übereinstimmung bzgl. der Aufteilung in zwei lineare Bereiche für $T > 293$ K und $T \leq 293$ K bestätigt die Annahme, daß den Leitfähigkeitsänderungen im Ein- und Aus-Feld

korrespondierende Effekte, hier die Bildung und Ausheilung von Membranporen zugrunde liegen, wobei τ_2 die Zeitkonstante der Bildung der P_2 -Poren und τ_R die Zeitkonstante der Ausheilung der größeren P_3 -Poren sind.

Die Aktivierungsenergien der Porenausheilung liegen in der gleichen Größenordnung wie beispielsweise der mittels elektroporativer Zellfärbung ermittelte Wert für *Chlamydomonas reinhardtii* [BOLDT, 1989].

Die Amplituden Y_1 , Y_2 und m_3 steigen ebenfalls mit Erhöhung der Temperatur. Dieses Verhalten läßt sich wiederum mit der Temperaturabhängigkeit der Membranfluidität und der Ionenbeweglichkeit begründen.

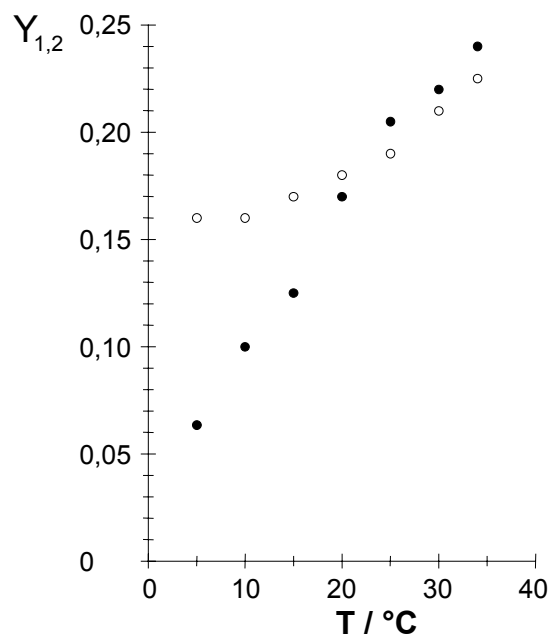


Abb. IV.13: Temperaturabhängigkeit der Amplituden der relativen Leitfähigkeitsänderungen Y_i des zeitlich nicht auflösbaren schnellen ($i = 1$, ●) und des exponentiellen ($i = 2$, ○) relativen Leitfähigkeitsanstiegs während Applikation eines Rechteckpulses der Feldstärke $E_{\text{appl}} = 1,5 \text{ kV/cm}$ und der Pulsdauer $t_E = 1 \text{ ms}$ an CHO-Zell-Pellets in 290 mM Sucrose.

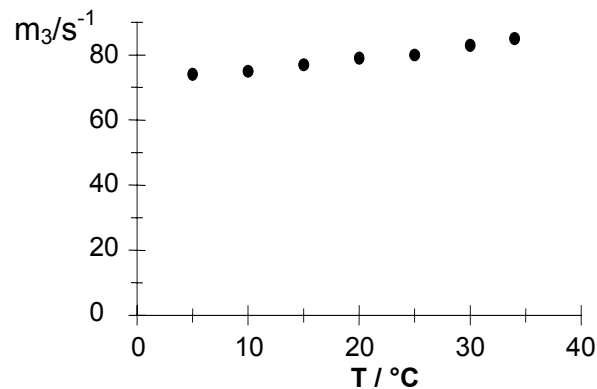


Abb. IV.14: Temperaturabhängigkeit der Steigung des linearen Anteils m_3 des relativen Leitfähigkeitsanstiegs während Feldpulsapplikation; experimentelle Bedingungen analog Abb.IV.13.

Die Verfolgung der feldinduzierten Bildung von Membranporen anhand der Leitfähigkeitsänderungen des untersuchten Zellsystems eröffnet die Möglichkeit, unmittelbar nach Feldpulsapplikation Aussagen über die Effektivität des gewählten Pulsprotokolls zu machen. Das bedeutet, man kann sofort erkennen, ob die applizierten Feldpulse Strukturen in der Membran geschaffen haben, die sich zum Einschleusen von Makromolekülen eignen. Andernfalls können unmittelbar entsprechende Veränderungen im Pulsprotokoll vorgenommen werden. Ohne diese Kontrollmöglichkeit bleibt nur die Auswertung der zellulären Antwort auf den Wirkstoff bzw. die DNA. Diese ist insbesondere im Falle des Gentransfers erst nach mehreren Tagen möglich. Anhand von Leitwertmessungen im Ein- und Ausfeld läßt sich außerdem die Kinetik von Porenbildung und -Ausheilung untersuchen. Damit kann das für einen Materialtransport zur Verfügung stehende Zeitfenster bestimmt werden.

(3) Impedanzspektrometrie vor und nach Feldpulsapplikation

Das charakteristische Verhalten von Materie im elektrischen Feld läßt sich durch den frequenzabhängigen komplexen Widerstand – die elektrische Impedanz – darstellen.

Das einfachste Ersatzschaltbild für biologische Zellen enthält drei Elemente (Abb. IV.15):

- Den externen Widerstand R_{ex} des interstitiellen, extrazellulären Mediums,
- den intrazellulären Widerstand R_{in} der dielektrischen Lipidphase der Zellmembranen,
- die Kapazität C_m der dielektrischen Lipidphase der Zellmembranen

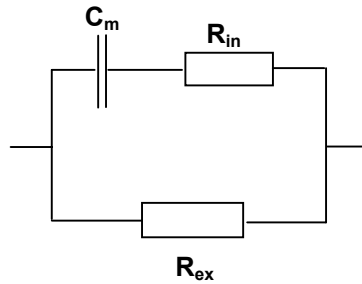


Abb. IV.15: Modell eines biologischen Gewebes für das β -Dispersionsgebiet. In erster Näherung entspricht die elektrische Ersatzschaltung einer RC-Kombination für den Membrankondensator C_m und den intrazellulären Widerstand R_{in} parallel zu einem Widerstand R_{ex} , der die extrazellulären Elektrolyte modelliert.

Die Grenzwerte $Z'_0 = Z'(\omega \rightarrow 0)$ (Gleichspannung) und $Z'_\infty = Z'(\omega \rightarrow \infty)$ (hochfrequente Wechselspannung) lassen sich durch Extrapolation aus den Impedanzspektren entnehmen.

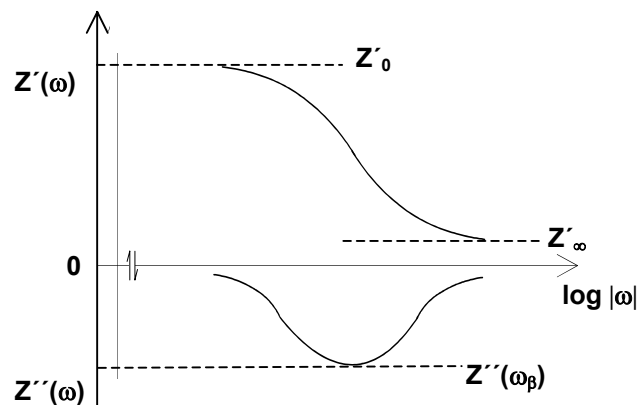


Abb. IV.16: Nyquist-Diagramm: $Z'(\omega)$ und $Z''(\omega)$ versus $\log(\omega)$ im β -Dispersionsbereich.

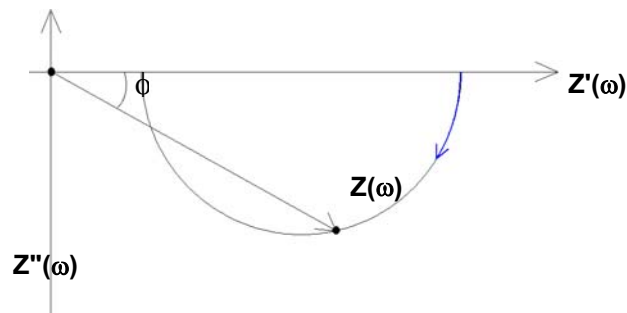


Abb. IV.17: Darstellung der Impedanz $Z(\omega)$ als komplexe Größe. In diesem Falle ist $Z''(\omega) < 0$ (negative Phasenverschiebung), d.h. die Impedanz hat ein kapazitives Verhalten. Durch den Pfeil wird die Impedanz für eine bestimmte Frequenz dargestellt. Durch Messung bei verschiedenen Frequenzen ($Z = f(\omega)$) und Verbinden der Pfeilspitzen erhält man die (gemessene) Ortskurve.

Die zeitliche Änderung des aus den an CHO-Zell-Pellets vor und nach Feldpulsapplikation aufgenommenen Impedanzspektren extrahierten Gleichstrom-Widerstandes Z'_0 ist

erwartungsgemäß im wesentlichen konsistent mit den Ergebnissen der Nachfeld-Leitfähigkeitsmessungen.

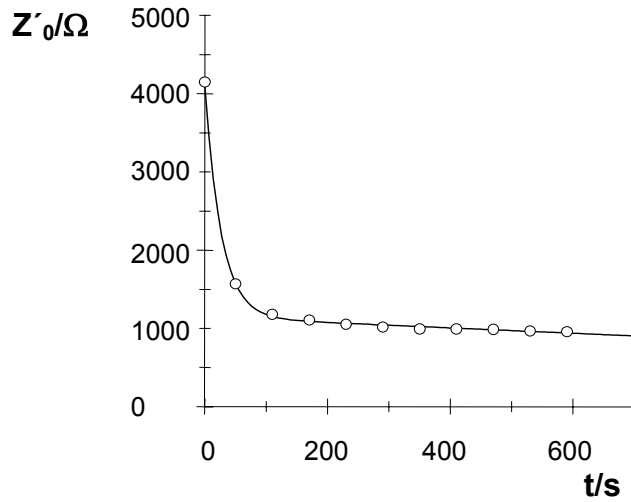


Abb. IV.18: Gleichstromwiderstand Z'_0 vor ($t = 0$) und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Feldpulsapplikation der Feldstärke $E_{\text{appl}} = 1,0 \text{ kV/cm}$ und der Pulsdauer $t_E = 1 \text{ ms}$ an CHO-Pellets in 290 mM Sucrose; $l_n = 1 \text{ mm}$.

Der (exponentielle) Abfall des Widerstandes nach Feldpulsapplikation wird hervorgerufen durch den Elektrolytaustritt aus den Zellen durch die langsam ausheilenden Membranporen. Aus den Daten erhält man die Zeitkonstante der Porenausheilung $\tau_r = 40 (\pm 4) \text{ s}$, was weitgehend konsistent mit den Ergebnissen der Leitwertmessungen und der SBG-Färbung ist.

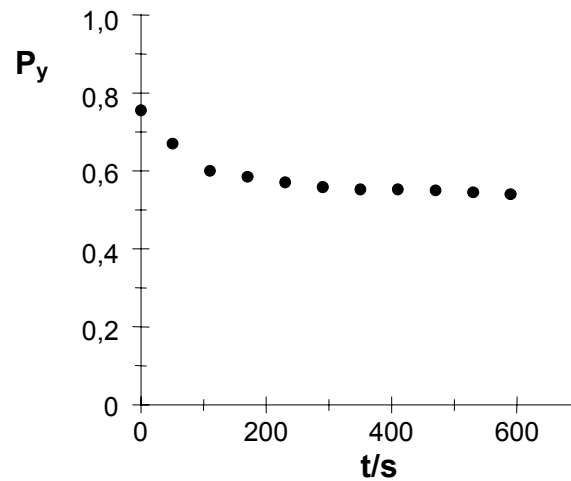
Aus der Beziehung [Pliquett und Pliquett, 2000; Süß et al., 2001]

$$R_{\text{in}} = \frac{Z'_{\infty} \cdot Z'_0}{Z'_0 - Z'_{\infty}} \quad (\text{IV.66})$$

ergibt sich über den ebenfalls aus dem Impedanzspektrum extrahierbaren Widerstand bei unendlich hoher Frequenz Z'_{∞} der Widerstand der intrazellulären Elektrolyte R_{in} , welcher ebenso wie der extrazelluläre Widerstand R_{ex} in den P_y -Wert eingeht. Dieser Impedanz-Parameter

$$P_y = \frac{R_{\text{ex}}}{R_{\text{ex}} + R_{\text{in}}} \quad (\text{IV.67})$$

ist nahezu proportional zu der von intakten Zellmembranen umgebenen Volumenfraktion [Pliquett und Pliquett, 2000; Süß et al., 2001].



App. IV.19: Die von intakten Zellmembranen umgebene Volumenfraktion, angezeigt durch den Impedanzparameter P_y vor ($t = 0$) und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Feldpulsapplikation der Feldstärke $E_{\text{appl}} = 1,0 \text{ kV/cm}$ und der Pulsdauer $t_E = 1 \text{ ms}$ an CHO-Pellets in 290 mM Sucrose.

Den Prozeß der Membranausheilung kann man bei der hier verwendeten zeitlichen Auflösung für das untersuchte System anhand des Parameters P_y nicht erkennen. Die Abnahme von P_y nach Feldpulsapplikation zeigt jedoch das Absterben der durch den elektrischen Feldpuls irreversibel geschädigten Zellen an. Hierbei handelt es sich offensichtlich im wesentlichen um einen Nachfeldeffekt.

Die Kapazität

$$C_m = [\omega_\beta (R_{\text{ex}} + R_{\text{in}})]^{-1} \quad (\text{IV.68})$$

des dielektrischen Lipidanteils nimmt nach Applikation des elektrischen Feldpulses im beobachteten Zeitbereich zu; $\omega_\beta = 2\pi f$ ist die Kreisfrequenz.

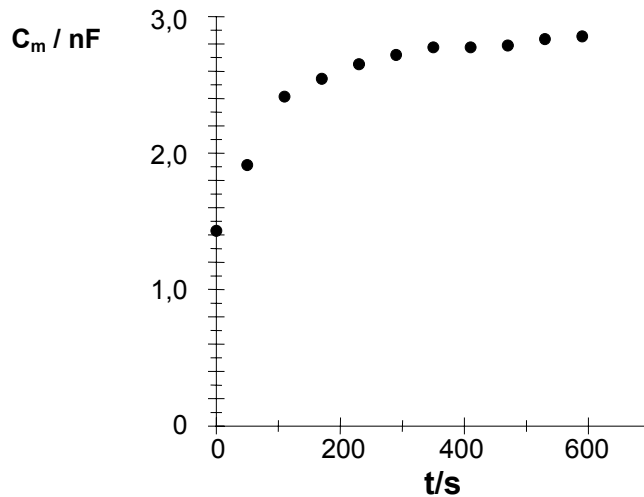


Abb. IV.20: Kapazität des dielektrischen Lipidanteils vor ($t = 0$) und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Feldpulsapplikation der Feldstärke $E_{\text{appl}} = 1,0 \text{ kV/cm}$ und der Pulsdauer $t_E = 1 \text{ ms}$ an CHO-Pellets in 290 mM Sucrose.

Trotz der irreversiblen Schädigung einiger Zellmembranen steigt die Kapazität nach Applikation des Feldpulses im betrachteten Zeitintervall stetig an. Dieser Befund ist konsistent mit einer Schwellung der Zellen, bzw. strukturellen Veränderungen der Lipidmembranen und einer damit verbundenen Vergrößerung der Membranoberfläche. Dieser Effekt überwiegt bei der hier betrachteten niedrigen Feldstärke, da nur ein geringer Anteil der Zellen tatsächlich irreversibel geschädigt wird.

(4) Elektroporative Zellfärbung

(4.1) Pulsdauerabhängigkeit der elektroporativen Anfärbbarkeit und der Leitfähigkeitsänderungen

Die minimale Pulsdauer $t_{E,\text{min}}$, bei der eine elektroporative Anfärbbarkeit der CHO-Zellen überhaupt sichtbar wird, beträgt für den verwendeten Feldstärkebereich etwa 0,2 ms. Bei dieser Pulsdauer geht die Amplitude des Leitfähigkeitsanteils Y_2 in Sättigung. Dieser Befund ist konsistent mit der Annahme, daß erst größere Membranporen, hier im wesentlichen der Porenzustand P_3 , dessen Bildung erst in diesem Zeitbereich einsetzt, einen Transmembrantransport von Makromolekülen - hier SBG - zulassen.

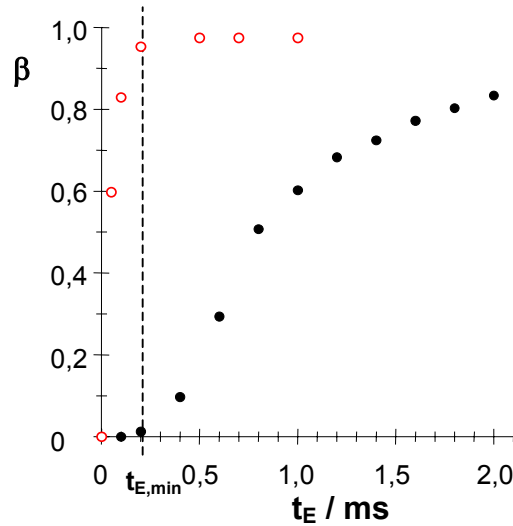


Abb. IV.21: Anteile $\beta = f_{c,\text{total}}$ gefärbter Zellen nach Feldpulsapplikation der Feldstärke $E_{\text{appl}} = 2 \text{ kV/cm}$ in Gegenwart von SBG (•) und Amplituden des Parameters $\beta = Y_2$ der Einfeld-Leitfähigkeitsänderungen (○) abhängig von der Pulsdauer t_E nach entsprechender Normierung auf $0 \leq \beta \leq 1$.

(4.2) Ermittlung der Porenausheilkinetik durch elektroporativen Farbstofftransfer

Nach Applikation des Feldpulses verbleibt die Membran noch einige Zeit im permeablen Zustand. Die Ausheilung der langlebigen Poren kann verfolgt werden, indem man den makromolekularen Farbstoff SERVA Blau G (SBG) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Feldpulsapplikation zu der Zellsuspension gibt.

Kinetischen Betrachtungen läßt sich das folgende Schema zugrundelegen (NEUMANN, BOLDT, 1989):



Dabei ist C der geschlossene, P der porierte Membranzustand, G_{SBG} steht für die gefärbte Zelle. k_p und k_R sind die Geschwindigkeitskoeffizienten der Porenbildung und Ausheilung, k_f ist der Geschwindigkeitskoeffizient des Farbstoffeintritts in die Zelle.

Unter der Annahme, daß die Farbstoffaufnahme viel schneller verläuft, als das Ausheilen der Poren, $k_f \gg k_R$, gilt nach Farbstoffzugabe näherungsweise $[P] = [G_{\text{SBG}}]$. Die Abnahme von $[P]$ mit der Zeit t kann somit durch Gl. (IV.70) beschrieben werden:

$$-\frac{d[G_{\text{SBG}}]}{dt} = k_R[P] \quad (\text{IV.70})$$

Der Bruchteil permeabilisierter Zellen $[P]$ ergibt sich nach Gl. (IV.71):

$$[P] = \frac{N_P}{N_T} \quad (\text{IV.71})$$

N_P ist die Anzahl der permeabilisierten Zellen und N_T die Gesamtzahl. Die Integration mit den Randbedingungen $t = 0$ und $t = \infty$ liefert unter der Annahme, daß sich der Prozeß durch ein einfaches Exponential beschreiben läßt, Gl. (IV.72):

$$([P(t)] - [P]_{\infty}) = ([P]_0 - [P]_{\infty}) \cdot e^{-k_R t} \quad (\text{IV.72})$$

Hieraus läßt sich - zumindest näherungsweise - der Geschwindigkeitskoeffizient k_R der Porenausheilung ermitteln.

Der Bruchteil anfärbbarer Zellen nach Applikation von Feldpulsen an CHO-Pellets fällt abhängig vom Zugabezeitpunkt des Farbstoffes exponentiell ab (Abb III.11).

Die Anpassung eines einzelnen Exponentials liefert

$$k_R = 2,3 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1},$$

$$\tau_R = 44 \pm 3 \text{ s}.$$

Die erhaltenen Werte sind in guter Übereinstimmung mit denen aus der Auswertung der Nachfeld-Leitfähigkeitsdaten (s.o.). Das bedeutet, daß beide Untersuchungsmethoden - Leitwertmessungen und Farbstoffaufnahme - letztlich den gleichen Prozeß, nämlich die Ausheilung der großen P_3 -Membranporen im Nachfeld beschreiben. Der Zeitbereich nach Feldpulsapplikation, in dem ein Einschleusen von Makromolekülen in die Zellen noch möglich ist, läßt sich somit durch Leitfähigkeitsmessungen ermitteln. Der experimentelle Aufwand ist hier gegenüber der beschriebenen Färbemethode deutlich verringert.

(5) Zusammenstellung mehrerer Methoden / Effekte

Die Verwendung unterschiedlicher Indikatorsysteme für die Membranelektroporation, wie Farbstofftransfer, Leitfähigkeitsänderungen oder die Detektion von Polynukleotiden im extrazellulären Medium zeigt, daß es für jedes Phänomen unterschiedliche charakteristische Feldstärkebereiche gibt.

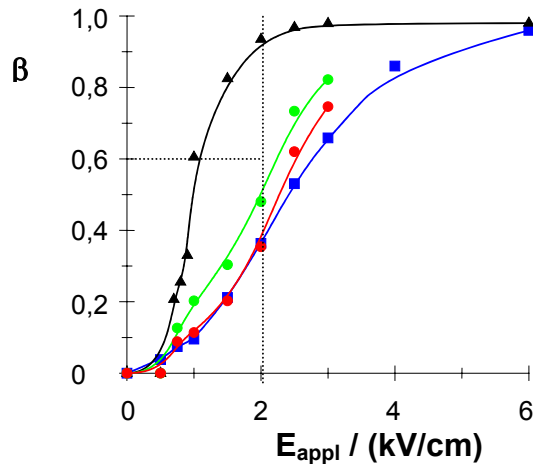


Abb. IV.22: Feldstärkeabhängigkeit des Leitfähigkeitsanteils Y_2 (\blacktriangle), der Zellfärbung mit SBG (\bullet), des Anteils getöteter Zellen (\bullet) und des Absorptionssignals in Folge des Austritts von RNA / DNA (\blacksquare) bei Feldpulsapplikation ($t_E = 1$ ms) an CHO-Zellpellets in 290 mM Sucrose nach entsprechender Normierung auf $0 \leq \beta \leq 1$.

Aus dem Vergleich der gezeigten Daten lassen sich die folgenden Schlußfolgerungen ziehen:

Die für dieses System optimale Feldstärke für den Farbstofftransport liegt im Bereich der Sättigung der Amplitude Y_2 . Das ist wiederum konsistent mit der Annahme, daß für einen Transmembrantransport wohl der Porenzustand P_3 verantwortlich ist.

Der Austritt von Polynukleotiden korreliert weitgehend mit dem Anteil irreversibel geschädigter Zellen. Die Messung der charakteristischen optischen Absorption von Polynukleotiden im extrazellulären Medium kann demnach zur Bestimmung des Anteils irreversibel geschädigter Zellen dienen.

(6) Elektrodeneffekte

Die feldpulsinduziert permeabilisierten bzw. irreversibel geschädigten Zellen sind offensichtlich nicht homogen über den Bereich zwischen den Elektroden verteilt (III.14, 15) (vgl. PLIQUETT et al., 1996). Für das betrachtete System müssen demnach zwei Effekte berücksichtigt werden, zum einen der (vernachlässigbare) Potentialabfall $\Delta\varphi = -(U_{\text{appl}} - U_{\text{nom}})$ zwischen Elektroporator und Elektroden, zum anderen Elektrodeneffekte.

Die auch bei polierten Elektroden verbleibende Oberflächenrauigkeit sowie die Ausbildung einer elektrischen Doppelschicht führen zu einem erhöhten Spannungsabfall $\Delta\varphi_s$ nahe den Elektrodenoberflächen. Damit sind die Zellen in unmittelbarer Nähe der Elektroden besonders hohen Feldstärken ausgesetzt.

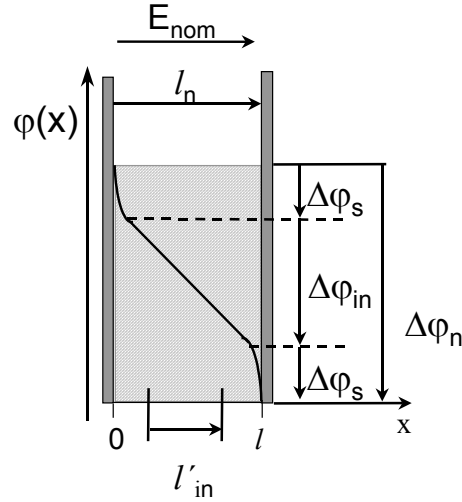


Abb. IV.23.: Schematische Darstellung des elektrischen Potentials $\varphi(x)$ zwischen zwei parallelen Plattenelektroden. $U_{\text{nom}} = E_{\text{nom}} \cdot l_n = -\Delta\varphi_n$ ist die nominale Spannung zwischen den äußeren Elektroden bei einer gegebenen applizierten Spannung $U_{\text{appl}} = E_{\text{appl}} \cdot l_n$.

$$U_{\text{nom}} = E_{\text{nom}} \cdot l_n = -\Delta\varphi_n \quad (\text{IV.73})$$

ist die nominale Spannung U_{nom} zwischen den äußeren Elektroden bei einer applizierten Spannung

$$U_{\text{appl}} = E_{\text{appl}} \cdot l_n \quad (\text{IV.74})$$

Der Potentialabfall

$$\Delta\varphi_n = \varphi_n(x = l_n) - \varphi_n(x = 0) = 2 \Delta\varphi_s + \Delta\varphi_{\text{in}} \quad (\text{IV.75})$$

kann in einen Oberflächenanteil $\Delta\varphi_s$ und einen inneren Anteil

$$\Delta\varphi_{\text{in}} = -E_{\text{in}} \cdot l_{\text{in}} \quad (\text{IV.76})$$

unterteilt werden. Dabei ist das innere elektrische Feld definiert als

$$E_{\text{in}} = -\Delta\varphi_{\text{in}} / l_{\text{in}} = -\Delta\varphi'_{\text{in}} / l'_{\text{in}} \quad (\text{IV.77})$$

Die experimentellen Befunde sind konsistent mit Berechnungen von GEHL et al. (1999) zur Elektroporation von Muskelgewebe bzw. von SEMROV und MIKLAVCIC (1998) für Tumorgewebe.

Die Messungen mit der Vier-Elektroden-Meßkammer zeigen, daß bei den gewählten experimentellen Bedingungen die Elektrodenbeschichtung mit Agarose nicht zu einer Verringerung des effektiven Elektrodenabstandes l_n und damit zu einer Erhöhung der Feldstärke E_{in} führt.

Die feldinduzierte Permeabilisierung, insbesondere die irreversible Zellschädigung ist - wie bereits erwähnt - größer in unmittelbarer Nähe der Elektrodenoberflächen. Diese weisen, obwohl sie poliert sind, mikroskopische Oberflächenrauigkeiten auf. Wenn nun die elektrodennahen Zellen stärker betroffen sind als diejenigen in der Pelletmitte, sollte in den Randbereichen ein massiver Elektrolytaustritt stattfinden, die ausgetretenen Kationen ((K^+, Mg^{2+}, \dots)) und Anionen ($(HCO_3^-, Cl^-, H_2PO_4^-, \dots)$) durchwandern das Pellet entlang der Feldlinien des schwachen Meßfeldes. Diese eindimensionale (Elektro-) Diffusion ist charakterisiert durch die Zeit $t_D = l_n^2 / 2 \bar{D}$, wobei $\bar{D} = 2 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ (bei $T = 293 \text{ K}$, 20°C) der mittlere Diffusionskoeffizient der kleinen Kationen und Anionen ist. Für zwei unterschiedliche Elektrodenabstände, in diesem Fall $l_2 = 2 l_1$, muß das Verhältnis der Diffusionszeiten $t_D(l_2) / t_D(l_1) = (l_2 / l_1)^2 = 4$ sein.

Die Porenausheilzeit ist eine aus den $Y^{\text{off}}(t)$ – Daten ermittelte charakteristische Größe für $t \geq t_E$. Nach KAKORIN et al. (1998) läßt sich die Ausfeldrelaxation mit

$$Y^{\text{off}}(t) = \Delta\lambda_3(t) / \lambda_0 = \Delta\lambda_3^{\text{max}} / \lambda_0 \cdot (1 - \exp[-k_f(t_E) \cdot \tau_R])(1 - \exp[-t / \tau_R]) \cdot \frac{1}{1 - \exp[-k_f(t_E) \cdot \tau_R]}$$

beschreiben. Würde die $Y^{\text{off}}(t)$ – Kurve im Wesentlichen hervorgerufen durch die Diffusion von Elektrolyt aus den elektrodennahen, „stärker“ elektroporierten Zellen, müßte die Beziehung

$$\frac{\tau_R(l_2)}{\tau_R(l_1)} = \frac{t_D(l_2)}{t_D(l_1)} = 4 \text{ gelten. Experimentell findet man aber } \tau_R(l_2) = \tau_R(l_1), \text{ konsistent mit } \tau_R =$$

τ_3^0 , d.h. die Leitfähigkeitsrelaxation im Nachfeld $Y^{\text{off}}(t)$ ist hervorgerufen durch die ausheilenden Membranporen, die während des elektrischen Feldpulses in der kinetischen Mode (3) gebildet wurden.

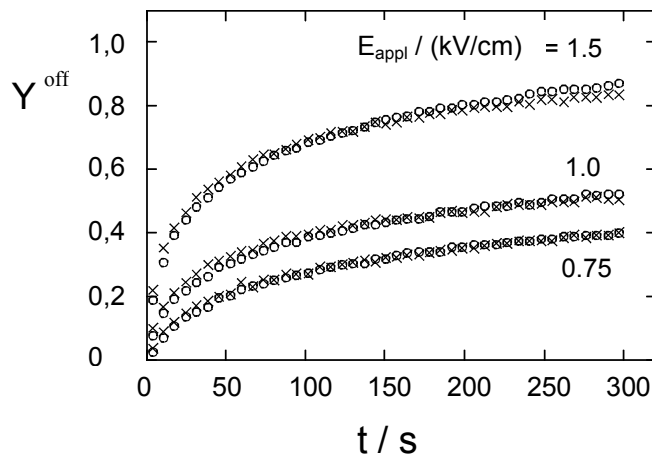


Abb. IV.24: Nachfeld-Leitfähigkeitsrelaxationen $Y^{\text{off}}(t)$ im Zell-Pellet nach Feldpulsapplikation der Feldstärken $E_{\text{appl}} / (\text{kV/cm}) = 0,75; 1,0; 1,5$ mit zwei unterschiedliche Elektrodenabständen: (o) $l = 1 \text{ mm}$ und (x) $l = 2 \text{ mm}$, präpariert bei $\text{RCF} = 90 \text{ g}$ in 290 mM Sucrose.

(6.1) Elektroporation adhärenter Zell-Oligoschichten

Das verstärkte Auftreten permeabilisierter Zellen in Elektrodennähe läßt sich ebenfalls bei Zell-Oligoschichten zeigen. Hier wird eine deutliche Asymmetrie gefärbter Bereiche sichtbar. An der Anode (+) tritt eine stärkere Anfärbung bzw. ein breiterer stark angefärbter Bereich auf als an der Kathode (-).

Diese Asymmetrie läßt sich vor allem durch Sekundäreffekte aufgrund des erhöhten Potentialabfalls $\Delta\phi_s$ in Elektrodennähe deuten. Zu nennen sind hier lokale pH-Wert-Änderungen aufgrund von Elektrolyseprozessen. Da Protonen durch den Grotthus-Mechanismus schneller wandern als Hydroxidionen, sollte der angesäuerte Bereich (kurzfristig) breiter sein als der mit erhöhtem pH-Wert. Weiterhin gehen bei hohen Elektrodenpotentialen an der Anode Metallionen in Lösung, die eine zellschädigende Wirkung haben können [TOMOV und TSONEVA, 2000].

(6.2) Elektrodenbeschichtung und elektroporative Anfärbbarkeit

Das erhöhte elektrische Feld in Elektrodennähe führt zu irreversibler Schädigung der hier lokalisierten Zellen. Insbesondere in Hinblick auf biotechnologische und medizinische Anwendungen müssen geeignete Maßnahmen zur Minimierung dieses Effektes getroffen werden.

Es wurde gefunden, daß bei größeren Elektrodenabständen der Anteil nicht geschädigter, transient permeabilisierter Zellen erhöht ist, dader Anteil der Zellen im Pelletinneren relativ zum Anteil der Zellen an den Elektrodenoberflächen größer ist (vgl. Abb. III.13).

Eine dünne (ca. 0,14 mm) Beschichtung der Elektroden mit einem Agarosegel erhöht ebenfalls den Anteil transient permeabilisierter Zellen, weil der hohe Potentialabfall in unmittelbarer Elektrodennähe durch das Gel verläuft und damit in diesem Bereich keine Schädigung von Zellen hervorruft.

(6.3) Elektrodenbeschichtung und Leitfähigkeitsänderungen

Die relativen Leitfähigkeitsänderungen in der Einfeld-Phase für Elektroden mit und ohne Agarosebeschichtung sind weitestgehend identisch (vgl. Abb.III.16). Der höhere Anteil irreversibel geschädigter Zellen bei Verringerung des Elektrodenabstandes ist demnach aus den Ein-Feld-Leitfähigkeitsänderungen nicht ersichtlich. Das bedeutet, daß der elektrische Feldpuls zwar die Ursache der irreversiblen Schädigung einiger Zellen darstellt, das eigentliche Absterben jedoch ein späterer Nach-Feld-Effekt ist.

Die Daten des elektroporativen Farbstofftransfers zeigen, daß die Gesamtzahl der permeabilisierten Zellen $f_{c,total}$ bei Verwendung derselben Elektroden und derselben Zellcharge mit und ohne Beschichtung der Elektroden im Rahmen des Fehlers gleich sind.

Entscheidende Unterschiede werden erst im Anteil der irreversibel geschädigten Zellen $f_{c,irrev}$ deutlich, der bei Verwendung einer Agarosebeschichtung der Elektroden deutlich geringer ist.

Weiterhin sind nach der Feldpulsapplikation in unmittelbarer Nähe der Elektroden wesentlich mehr irreversibel geschädigte Zellen zu finden als in der Pelletmitte (Abb. III.14).

Zusammenfassend erscheint es, daß der hohe Anteil irreversibel geschädigter Zellen bei Feldpulsapplikation ohne Elektrodenbeschichtung in elektrochemischen Effekten begründet ist. Neben dem erhöhten Potentialabfall in Elektrodennähe aufgrund der Oberflächenrauigkeit der Elektroden, neben lokalen pH-Wert-Änderungen aufgrund der Elektrolyse von Wasser sind hier auch Freisetzungen von Metallionen von der Anode zu berücksichtigen (TOMOV, TSONEVA, 2000). Treten die entstandenen Ionen durch die Membranporen in die Zellen ein, kann das zu einer massiven Schädigung der Zellen führen. Hierauf deutet auch die deutliche Abnahme des Impedanz-Parameters P_y (s.o.) im Nachfeld-Bereich hin.

Die Agarose-Beschichtung der Metallelektroden hat hier also wie oben bereits beschrieben zwei wesentliche Effekte: Sowohl der erhöhte Potentialabfall an den Oberflächen der Metallelektroden als auch die Freisetzung der zellschädigenden Ionen (H^+ , OH^- , Me^{n+}) finden innerhalb des Gels statt.

(6.4) Elektrodenbeschichtung bei Nadel-Einstichelektroden

Die Agarosebeschichtung von Metallelektroden zur Applikation elektrischer Feldpulse ist auch für Nadel-Einstichelektroden anwendbar. Voraussetzung ist aber ein Aushärten der Beschichtung vor dem Einstich. Die Agarosebeschichtung bietet zudem die Möglichkeit der Beladung des Materials mit den zu verabreichenden Wirkstoffen analog zum verwendeten Farbstoff Calcein. Der beobachtete Verbleib des Gels im Stichkanal kann zum Verschluß der Wunde beitragen und so beispielsweise eine mögliche Tumormetastasierung durch abgelöste und verselbständigte Zellen verhindern. Aufgrund der hohen Biokompatibilität von Agarose sind bei dem beschriebenen Verbleib des Gelmaterials im Gewebe kaum Komplikationen zu erwarten.

(7) Elektroporativer DNA-Transfer in CHO-Zellen

(7.1) Probenpräparation

Der elektroporative DNA-Transfer in Zellpellets erfordert, daß das Plasmid bereits vor der Zentrifugation zur Zellsuspension gegeben wird. Die verwendete Zentrifugierbeschleunigung reicht für eine Sedimentation der DNA-Plasmide alleine nicht aus, so daß man davon ausgehen kann, daß die DNA an die Zelloberflächen adsorbiert und diese Adsorbate dann gemeinsam sedimentieren.

Zur Ermittlung des tatsächlichen Transfektionserfolges müssen sowohl die transfizierten N_{GFP} als auch die durch Feldpulsapplikation in Gegenwart von DNA irreversibel geschädigten Zellen N_{irrev} berücksichtigt werden. Eine entsprechende Ermittlung des Anteils transfizierter Zellen f_{GFP} an der Gesamtheit N_{T} erfolgt nach

$$f_{\text{GFP}} = \frac{N_{\text{GFP}}}{N_{\text{T}}} = \left(1 - \frac{N_{\text{irrev}}}{N_{\text{T}}}\right) \cdot \frac{N_{\text{GFP}}}{N_{\text{T}} - N_{\text{irrev}}} \quad (\text{IV.78})$$

(7.2) Auswahl der optimalen Pulsparameter

Bei CHO-Zellen erzeugt hier ein einzelner Hochspannungs-(HV-)Puls keine Transfektion. Vielmehr ist die Kombination eines kurzen Hochspannungsbereichs (HV) zur Bildung von kleineren Membranporen, gefolgt von einem anschließenden längeren Bereich niedrigerer Spannung (LV) [KLENCHIN et al., 1991] oder die Applikation mehrerer kurzer Pulse [NEUMANN et al., 1982; MIR et al., 1995; ZHENG et al., 1991] zum erfolgreichen Transfer von DNA in die Zellen notwendig. Weder der HV- noch der LV- Puls für sich allein liefert brauchbare Transfektionsergebnisse. Diese Beobachtung ist konsistent mit der Annahme, daß effizienter elektroporativer DNA-Transfer in einen elektroporativen und einen nach-elektroporativen Anteil gegliedert werden kann. Wahrscheinlich ist, daß der LV-Puls auf noch nicht ausgeheilte Poren des vorhergehenden HV-Pulses trifft und diese schon bei niedriger Feldstärke und entsprechend langen Pulsdauern größere Poren ausbilden.

Abgesehen von einem nicht unerheblichen Anteil toter Zellen ergeben sich bei den gegebenen Pulsdauern ($t_{\text{E1}} = 0,5 \text{ ms}$, $t_{\text{E2}} = 10 \text{ ms}$) die besten Transfektionserfolge bei $E_{1,\text{appl}} = 2,0 \text{ kV/cm}$ und $E_{2,\text{appl}} = 0,15 \text{ kV/cm}$ (Abb. III.20).

Die verwendeten Pulsdauern t_{E1} und t_{E2} orientieren sich an den Daten des elektroporativen Transfers makromolekularer Farbstoffe und der Messungen der Leitwertänderungen während Feldpulsapplikation. Eine Verlängerung des HV-Bereiches zum Zwecke des elektroporativen

DNA-Transfers ist aufgrund zu großer irreversibler Zellschädigung nicht sinnvoll, wohl aber sollten Mehrfachpulse (s.o.) verwendet werden.

Die irreversible Zellschädigung wird hier sicherlich verstärkt durch die Verwendung von sterilen Einmal-Elektroporationsküvetten mit Aluminiumelektroden; Aluminium wirkt bekanntermaßen zytotoxisch.

(7.3) Ermittlung der einzusetzenden DNA-Konzentration

Neben der Wahl der Feldpulsparameter ist auch die einzusetzende DNA-Konzentration für den Transfektionserfolg von entscheidender Bedeutung.

Die meisten GFP-exprimierenden Zellen ergeben sich für das betrachtete System bei einem Verhältnis von 50 - 75 µg DNA auf 10^8 Zellen, bezogen auf ein Suspensionsvolumen von 300 µL. Der Anteil irreversibel geschädigter Zellen steigt deutlich mit der DNA-Konzentration, ein Effekt der in der Literatur [WINTERBOURNE et al., 1988] vielfach als Toxizität der DNA bezeichnet wird (Abb. III.21).

Da die Schädigung offensichtlich aus der Kombination von feldinduzierter Porenbildung und Anwesenheit von DNA resultiert, liegt es nahe, daß es sich ursächlich um einen Prozeß auf Membranebene handelt. Möglicherweise führt DNA, die nicht durch die Membran permeiert, sondern nur unvollständig in diese hineingezogen wird, zu Leckstellen, welche durch die Zellen nicht wieder repariert werden können und so zu einer irreversiblen Schädigung führen. Aktive Prozesse wie Apoptose als Antwort auf das Erkennen von Fremd-DNA in der Zelle scheiden hier aus, da diese erst mit einer größeren zeitlichen Verzögerung erkennbar würden und nicht bereits wenige Minuten nach dem Feldpuls.

(7.4) Verwendung von Edelstahlelektroden

Edstahlelektroden sollten Aluminiumelektroden aufgrund geringerer Elektrodeneffekte prinzipiell vorgezogen werden. Insbesondere bei Verwendung von Elektroporationsmedien geringer Ionenstärke zeigt sich jedoch, daß der Anteil transfizierter Zellen bei Verwendung von Edelstahlelektroden deutlich geringer ist als bei Verwendung von Aluminiumelektroden. Gleichzeitig verringert sich aber auch der Anteil irreversibel geschädigter Zellen (Abb. III.22).

Gibt man die Zellsuspension in Elektroporationsküvetten mit Aluminiumelektroden, gehen Aluminiumionen anodisch in Lösung. Diese dreifach geladenen Kationen dienen der Abschirmung der negativen Ladungen an Zellmembran und DNA bzw. als eine Art Bindeglied, so daß ein Kontakt der beiden Systeme erleichtert bzw. überhaupt erst ermöglicht wird [NEUMANN et al., 1996]. Der nun ermöglichte DNA-Transfer in die Zellen führt wie oben

bereits beschrieben zu einem nicht unerheblichen Anteil irreversibel geschädigter Zellen. Die elektroporativ in die Zellen eingeschleusten Aluminiumionen können dabei ebenfalls zellschädigend wirken.

Kommerziell erhältliche Elektroporationsküvetten werden in aller Regel mit Aluminiumelektroden ausgestattet. Dies hat aber lediglich produktionstechnische Gründe, der oben beschriebene vermeintliche Vorteil der Bereitstellung von Kationen wurde bislang nicht beschrieben (Literaturrecherche und persönliche Anfrage bei Fa. Bio-Rad).

(7.5) Einfluß des interstitiellen Mediums

Zugabe von $AlCl_3$ zum Sucrose-Medium

Der beschriebene Einfluß von Aluminiumionen auf das Transfektionsergebnis läßt sich anhand der Zugabe von $AlCl_3$ zum Elektroporationsmedium zeigen.

In Anwesenheit des Aluminiumsalzes wird der Anteil transfizierter Zellen bei Verwendung von Edelstahlelektroden gegenüber der Probe ohne $AlCl_3$ etwa verzehnfacht. Weiterhin zeigen sich erneut im Anstieg des Anteils irreversibel geschädigter Zellen der schädigende Effekt von DNA an bzw. in der Zellmembran und der postulierte schädigende Einfluß der Aluminiumionen (Abb. III.23 und III.24).

Agarose-Beschichtung von Al-Elektroden

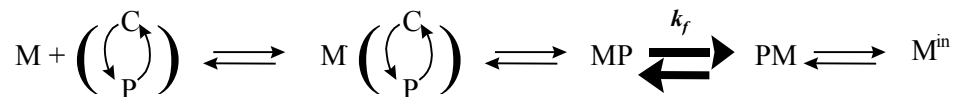
Eine Beschichtung der Aluminiumelektroden mit Agarosegel hat eine Abnahme sowohl des Anteils transfizierter Zellen als auch des Anteils irreversibel geschädigter Zellen zur Folge (Abb. III.25). Der Anteil transfizierter Zellen liegt dabei aber immer noch deutlich über dem bei Verwendung eines vergleichbaren Systems mit Edelstahlelektroden. Das bedeutet, daß es nicht gelingt, den Eintritt von Aluminiumionen in das Elektroporationsmedium durch die Beschichtung in ausreichendem Maße zu verhindern. Die als Elektroden dienenden Metallplatten liegen an der Kunststoffküvette an, deshalb ist eine vollständige Beschichtung insbesondere der dem Pellet abgewandten Seite nicht möglich. Weiterhin liegt die Vermutung nahe, daß neben den Metallionen noch weitere Effekte eine Rolle spielen.

$MgCl_2$ -Zusatz zum Sucrose-Medium

Der Einfluß positiv geladener Ionen kann auch anhand des Zusatzes von Mg^{2+} (als $MgCl_2$) zum Elektroporationsmedium gezeigt werden. Schon die Zugabe millimolarer Mengen führt bei

Verwendung von Edelstahlelektroden zu einer Steigerung des Anteils transfizierter Zellen (Abb. III.26) [NEUMANN et al., 1982].

Entscheidend für einen elektroporativen Transfer von DNA in die Zellen ist demnach wie bereits angedeutet das Ermöglichen eines engen Membran-DNA-Kontaktes gemäß dem folgenden Schema.



Das Makromolekül M (hier DNA) bindet zunächst über die Metallionen an die Membran. Eine Akkumulation von Ladungsträgern an dieser Stelle kann durch Verstärkung der lokalen Transmembranpotentialdifferenz die elektroporative Porenbildung ($C \rightarrow P$) erleichtern. Die an den porierten Membranzustand P gebundene DNA kann die Zellmembran passieren und letztlich in die Zelle wandern (M^{in}).

Das erreichbare Transfektionsergebnis ist hier jedoch verhältnismäßig gering.

MILLER et al. beschrieben 1988 einen negativen Einfluß höherer Konzentrationen zweiwertiger Kationen, insbesondere Ca^{2+} und Mg^{2+} auf das Transformationsergebnis, weshalb ggf. Alkalimetallionen im Elektroporationsmedium bevorzugt werden sollten.

PBS als Elektroporationsmedium

PBS findet als Elektroporationspuffer verbreitet Verwendung [LINDL, BAUER, 1994]. Im Zusammenhang mit der Benutzung von Edelstahlelektroden zeigt sich jedoch ein allenfalls mäßiger Transfektionserfolg. Bessere Ergebnisse lassen sich mit einer Mischung aus 290 mM Sucrose und PBS (1:1, v/v) erreichen. Der Anteil transfizierter Zellen bezogen auf die nach dem Transfektionsexperiment wieder angewachsenen Zellen ($N_{\text{GFP}}/(N_{\text{T}} - N_{\text{irrev}})$) liegt zwar immer noch unter dem bei Anwendung von Aluminiumelektroden in 290 mM Sucrose, dies wird aber durch einen deutlich verringerten Anteil irreversibel geschädigter Zellen kompensiert. Daraus resultiert bezogen auf die Zellgesamtheit ein verhältnismäßig hoher Anteil transfizierter Zellen (Abb. III.27).

Im Hinblick auf Anwendungen der Methode als Therapieform ist ein möglichst geringer Anteil irreversibel geschädigter Zellen wie bereits erwähnt von entscheidender Bedeutung, wobei Variationen des umgebenden Mediums natürlich in Gewebe allenfalls bedingt möglich sind. Für rein biochemische Zwecke, d.h. die Proteinsynthese mittels transfizierter Zellen, ist der Anteil irreversibel geschädigter Zellen weniger problematisch. Hier genügen einige positive Klone, die dann selektiv weiter kultiviert werden.

(7.6) Einfluß der Packungsdichte der Zellen

Der Anteil f_{GFP} transfizierter Zellen bezogen auf die Gesamtheit des eingesetzten Zellmaterials steigt bei Pelletbildung mit $\text{RCF} = 3,6 \text{ g}$ gegenüber der Suspension um etwa einen Faktor $F_{\text{SS}} = 1,5$. Mit einer weiteren Erhöhung der Zentrifugiergeschwindigkeit und damit der Packungsdichte sinkt f_{GFP} wieder und liegt ab ca. 90 g unterhalb des für die Suspension erreichbaren Wertes (Abb. III.28; bzgl. 6×10^7 Zellen/mL).

Die charakteristische optische Absorption von DNA / RNA bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ im Überstand der Zellpellets bzw. des umgebenden Mediums der Zellsuspension zeigt bei geringer Zentrifugalbeschleunigung eine Abnahme der Absorption, bei $\text{RCF} \geq 14$ eine erneute leichte Zunahme.

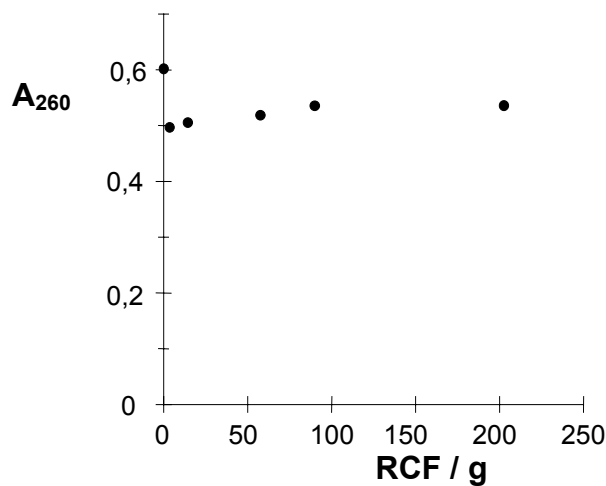


Abb. IV.25: Optische DNA / RNA-Absorption A_{260} bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ des interstitiellen Mediums einer Suspension von 6×10^7 Zellen/mL in 145 mM Sucrose, 75 mM PBS bzw. des Überstandes von Zellpellets nach 5 min Zentrifugation. Vor der Zentrifugation wurde jede Probe 10 min mit $75 \mu\text{g} / \text{mL}$ des GFP-Plasmids inkubiert. Die Absorbanz wird nach Verdünnung 1:5 gemessen.

Es ist zu vermuten, daß die absinkenden Zellen die adsorbierte DNA, vermittelt durch die positiven Ionen des Mediums (hier Na^+), mit in das Pellet ziehen und dort einschließen. Die in dem geringen interstitiellen Volumen des Zellaggregates befindliche DNA verbleibt aufgrund der räumlichen Einengung immer in unmittelbarer Nähe der Zelloberflächen, während in Suspension ein vielfacher freier Raum zur Verfügung steht. Neben der Erhöhung der Zelldichte wird damit auch die effektive DNA-Konzentration erhöht.

Bei einer Erhöhung der Packungsdichte werden zwei weitere Effekte wirksam:

Zum einen tritt offensichtlich ein Teil der DNA aus dem Pellet wieder in das überstehende Medium aus. Dies läßt sich anhand der ansteigenden Absorption bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ belegen. Daß es sich hierbei um DNA oder RNA aufgrund der mechanischen Belastung absterbender Zellen

handelt, konnte experimentell ausgeschlossen werden. Die hier verwendete Zentrifugalbeschleunigung hat keine Auswirkungen auf die Viabilität der Zellen.

Weiterhin wird hier die bereits für den elektroporativen Farbstofftransfer und die relativen Leitwertänderungen diskutierte Verringerung der effektiven Transmembranfeldstärke E_m wirksam, die beim Übergang von Zellen in Suspension zu dichter Packung um den Faktor $2/3$ (Abschnitt IV.(1)) abnimmt.

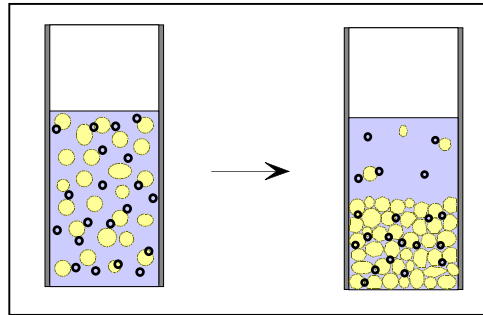


Abb. IV.26: Schematische Darstellung von Zellen und freier DNA in Suspension und nach anschließender Zentrifugation. Durch positiv geladene Ionen in der Lösung wird eine Wechselwirkung der Zellen mit der DNA ermöglicht, nach gemeinsamer Sedimentation wird die DNA im interstitiellen Volumen des Pellets eingeschlossen.

(7.7) Pulsform und Transfektionsergebnis

Die Erhöhung des Schwellenwertes für die HV-Pulsserien gegenüber den HV-LV-Pulsen läßt sich mit der kürzeren zur Porenöffnung zur Verfügung stehenden Pulsdauer erklären. Insbesondere bei Feldstärken $E_{appl} < 2,0 \text{ kV/cm}$ ist in 0,1 ms keine ausreichende Porenöffnung erfolgt [MIR, 1996].

(8) Schlußfolgerungen für die elektroporative Zellfusion

Die elektroporative Fusion biologischer Zellen setzt einen engen Zell-Zell-Kontakt in Bereich der porierten Flächen voraus, der bereits während der elektroporativen Zellfusion gegeben sein sollte [SUGAR, NEUMANN, 1987]. Die Fusion von Säugerzellen ist aufgrund der starreren Struktur und der auf der eigentlichen Lipidmembran aufgelagerten Glykokalyx erschwert, da hier die Kontaktbildung beeinträchtigt wird. Die Fusion der Säugerzellen wird ermöglicht durch die Feldpulsapplikation während der Zentrifugation bzw. zwischen zwei Zentrifugationen für jeweils mehrere Minuten. Ansätze zur (insbesondere heterozygoten) Fusion von Säugerzellen werden aktuell im Rahmen der Tumorimpfung [SCOTT-TAYLOR et al., 2000; KUGLER et al.,

2000] untersucht und haben damit einen konkreten Anwendungsbezug. Dabei können die zuvor beschriebenen Leitwertmessungen zur Optimierung der Feldpulsparameter dienen.

Die Schleimpilze hingegen sind in ihrer Struktur weniger rigide, was die Ausbildung eines ausreichenden Zellkontaktes erleichtert. Die spontane Bildung von Zellaggregaten im Hungerzustand ergibt sich aus der Ausschüttung des Botenstoffes cAMP und ist für etwa fünf Stunden stabil.

Das membranumhüllte Endoplasmatische Reticulum (ER) ehemals getrennter Zellen ist in der Lage, bei Kontakt spontan zu fusionieren, sich also zu durchmischen. Dieser Prozeß wird auch für das Wiederausheilen spontaner Abschnürungen postuliert.

Weiterhin bietet die Beobachtung von Fusionaten eine gegenüber Einzelzellen verbesserte Möglichkeit, dynamische intrazelluläre Vorgänge zu beobachten, wie z.B. die Bewegungsmuster von Mitochondrien.

LITERATUR

Abidor, I.G., Arakelyan, V.B., Chernomordik, L.V., Chizmadzhev, Yu.A., Pastushenko, V.F., Tarasevich, M.R., „Electric breakdown of bilayer lipid membranes. I. The main experimental facts and their qualitative discussion“, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **6**, 1979, 37-52.

Abidor, I.G., Barbul, A.I., Zhelev, D.V., Doinov, P., Bandrina, I.N., Osipova, E.M., Sukharev, S.I., „Electrical properties of cell pellets and electrofusion in a centrifuge“, *Biocim. et Biophys. Acta*, **1152**, 1993, 207-218.

Abidor, I.G., Li, L.-H., Hui, S.W., „Studies of cell pellets: I. Electrical properties and porosity“, *Biophysical J.*, **67**, 1994, 418-426.

Abidor, I.G., Li, L.-H., Hui, S.W., „Studies of cell pellets: II. Osmotic properties, electroporation, and related phenomena: Membrane interaction“, *Biophysical J.*, **67**, 1994, 427-435.

Boldt, E., „Elektroporation der Alge *Chlamydomonas reinhardtii*“, *Dissertation*, Bielefeld, 1989.

C.J.F. Böttcher, „Theory of electric polarization“, Vol. **1**, *Dielectrics in static fields*, Elsevier, Amsterdam, 1973, p. 377.

Bradford, M.M., „A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding“, *Analytical Biochemistry*, **72**, 1976, 248-254.

Cole, S., *Membrane, Ions and Impulses*, Berkeley, 1972, p. 568.

H. Dänzer, „Über das Verhalten biologischer Körper bei Hochfrequenz II“, *Ann. Physik*, **21**, 1934/35, 783-790.

Djuzeova, C.S., Zimmermann, U., Frank, H., Sukhorukov, V.L., Richter, E. Fuhr, G., „Effect of medium conductivity and composition on the uptake of propidium iodide into electroporabilized myeloma cells“, *Biocim. et Biophys. Acta*, **1284**, 1996, 143-152.

Eigen, M. and DeMayer, L. „Relaxation methods“, in Friess, S.L., Lewis, E.S., Weissberger, A. (eds.), *Techniques of Organic Chemistry*, Vol. **8**(2), John Wiley, New York, 1963, p. 895-1054.

Ferret, E., Evrard, C., Foucal, A., Gervais, P., „Volume changes of isolated human K562 leukemia cells induced by electric field pulses“, *Biotechn. and Bioeng.*, **67**, **5**, 2000, 520-528.

Fricke, H., „The electric permittivity of a dilute suspension of membrane-covered ellipsoids“, *J. Appl. Phys.*, **24**, 1953, 644-646.

Gehl, J., Sorensen, T.H., Nielsen, K., Raskmark, P., Nielsen, S.L., Skovsgaard, T., Mir, L.M., „In vivo electroporation of skeletal muscle: threshold, efficacy and relation to electric field distribution“, *Biocim. et Biophys. Acta*, **1428**, 1999, 233-240.

Glaser, R.W., Leikin, S.L., Chernomordik, L.V., Pastushenko, V.F., Sokirko, A.I., „Reversible electrical breakdown of lipid bilayers: formation and evolution of pores“, *Biocim. et Biophys. Acta*, **940**, 1988, 275-287.

Griese, T., Kakorin, S., Neumann, E., „Conductometric and electrooptic relaxation spectrometry of lipid vesicle electroporation at high fields“, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **4**, 2002, 1217-1227.

Heller, R., Jaroszeski, M.L., Glass, L.E., Messina, J.L., Rapaport, D.P., De Conti, R.C., Frenske, N.A., Gilbert, R.A., Mir, L.M., Reintgen, D.S., „Phase I/II trial for the treatment of cutaneous and subcutaneous tumors using chemoelectrotherapy“, *Cancer*, **77**, 1996, 964-971.

Jarozeski, M.J., Gilbert, R., Heller, R., „Electrochemotherapy: an emerging drug delivery method for the treatment of cancer“, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **26**, 1997, 185-197.

Jaroszeski, M.J., Gilbert, R., Nicolau, C., Heller, R., „In vivo gene delivery by electroporation“, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **35**, 1999, 131-137.

Kakorin, S., Neumann, E., „Ionic conductivity of electroporated bilayer membranes“, *Bioelectrochem.*, **56**, 2002, 163-166.

Kakorin, S. and Neumann, E., „Kinetics of the electroporative deformation of lipid vesicles“, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **102**, 1998, 670-675.

Kakorin, S., Redeker, E., Neumann, E., „Electroporative deformation of salt filled lipid vesicles“, *Eur. Biophys. J.*, **27**, 1998, 43-53.

Kinosita, K., Tsong, T.Y., „Voltage-induced pore formation and hemolysis of human erythrocytes“, *Biocim. et Biophys. Acta*, **471**, 1977, 227-242.

Kinosita, K., Tsong, T.Y., „Voltage-induced conductance in human erythrocyte membranes“, *Biocim. et Biophys. Acta*, **554**, 1979, 479-497.

Klenchin, V.A., Sukharev, S.I., Serov, S.M., Chernomordik, L.V., Chizmadzhev, Yu.A., „Electrically induced DNA uptake by cells is a fast process involving DNA electrophoresis“, *Biophys. J.*, **60**, 1991, 804-811.

Kugler, A., Stuhler, G., Walden, P., Zöller, G., Zobywalski, A., Brossart, P., Trefzer, U., Ullrich, S., Müller, C.A., Becker, V., Gross, A.J., Hemmerlein, B., Kanz, L., Müller, G.A., Ringert, R.-H., „Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell - dendritic cell hybrids“, *Nature Medicine*, **6**, **3**, 2000, 332-336.

Lindl, T., Bauer, J., *Zell und Gewebekultur*, G. Fischer Verlag, 3. Aufl., 1994, S. 195-196.

Maxwell, J.C., *Treatise on Electricity and Magnetism*, 3rd ed. Oxford Univ. Press, London, U.K, 1904, p. 435-441.

Meredith, R.E., Tobias, C.W., „II. Conduction in heterogenous systems“, *Adv. in Electrochem. and Electrochem. Engineering*, **2**, 1962, 15-47.

Miklavcic, D., Semrov, D., Mekid, H. and Mir, L.M., „A validated model of in vivo electric field distribution in tissues for electrochemotherapy and for DNA electrotransfer for gene therapy“, *Biochim.Biophys. Acta*, **1523**, 2000, 73-83.

Miller, J.F., Dower, W.J., Tomkins, L.S., „High voltage electroporation of bacteria: Genetic transformation of campylobacter jejuni with plasmid DNA“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 1988, 856-860.

Mir, L.M., Orlowski, S., Belehradek, J., Teissie', J., Rols, M.P., Sersa, G., Miklavcic, D., Gilbert. R., Heller, R., „Biomedical applications of electric pulses with special emphasis on antitumor electrochemotherapy“, *Bioelectrochem. and Bioenerg.*, **38**, 1995, 203-207.

Mir, L. M., Tounekti, O., Orlowski, S., „Bleomycin: Revival of an old drug“, *Gen. Pharmac.*, **27**, 1996, 745-748.

Müller, H.P., Schallreuter, D., Neumann, E., „Electrooptics and conductance anisotropy of polyelectrolyte DNA“, in Watanabe (ed.), *Dynamic Behavior of Macromolecules, Colloids, Liquid Crystals and Biological Systems by Optical and Electro-Optical Methods* Hirokawa Publ Co., Tokyo, 1989, p. 281-286.

Neumann, E., Rosenheck, „Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes“, K., *J. Membr. Biol.*, **10**, 1972, 279-290.

Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y. and Hofschneider, P.H., „Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields“, *EMBO J.*, **1**, 1982, 841-845.

Neumann, E., „The Relaxation Hysteresis of Membrane Electroporation“, in Neumann, E., Sowers, A., Jordan, C. (eds.), *Electroporation and electrofusion in cell biology*, Plenum Press, NY, 1989, p. 61-82.

Neumann, E., Boldt, E., in Allen, M. J., Cleary, S. F., Hawkrigde, F. M., „Membrane electroporation: biophysical and biotechnical aspects“ in Allen, M. J., Cleary, S. F., Hawkrigde, F. M. (eds.), *Charge and Field Effects in Biosystems-2*, Plenum Publishing Cooperation, 1989, p. 373-382.

Neumann, E., Boldt, E., „Membrane electroporation: The dye method to determine the cell membrane conductivity“, in Nicolau, C., Chapman, D. (eds.), *Horizons in membrane technology, Progress in clinical and biological research*, Wiley-Liss; NY, 1990, p. 69-83.

- Neumann, E., „Membrane electroporation and direct gene transfer“, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **28**, 1991, 247-267.
- Neumann, E., Kakorin, S., Tsoneva, I., Nikolova, B., Tomov, T., „Calcium-mediated DNA adsorption to yeast cells and kinetics of cell transformation by electroporation“, *Biophys. J.*, **71**, 1996, 868-877.
- Neumann, E., „Electric and magnetic field reception“, in Meyers, R.A. (ed.), *Encyclopedia of molecular biology and molecular medicine*, VCH-Publ. Inc., New York, 1996, 2nd ed. 2004 Vol. 8, p. 1-20.
- Neumann, E., Tönsing, K., Kakorin, S., Budde, P., Frey, J., „Mechanism of electroporative dye uptake by mouse B cells“, *Biophys. J.*, **74**, 1998, 98-108.
- Neumann, E., Kakorin, S., Tönsing, K., „Fundamentals of electroporative delivery of drugs and genes“, *Bioelectrochem. and Bioenerg.*, **48**, 1999, 3-16.
- Neumann, E., Kakorin, S., „Electroporation of curved lipid membranes in ionic strength gradients“, *Biophys. Chem.*, **85**, 2000, 249-271.
- Neumann, E., Pliquett, U., Seipp, T., Schmeer, M., „Biokompatible Elektroden für in vivo Elektroporation zur Wirkstoffzufuhr“, *Gebrauchsmuster*, Nr. 203 02 861.9, 2003.
- Parsegian, V.A., „Energy of an ion inside the pore“, *Annals – New York Academy of Sciences*, **264**, 1975, 161-174.
- Pavlin, M., Slivnik, T. and Miklavcic, D., „Effective conductivity of cell suspensions“, *IEEE Transact. Biomed. Eng.*, **49**, 2002, 77-80.
- Pliquett, U., Gift, E.A., Weaver, J.C., „Determination of the electric field and anomalous heating caused by exponential pulses with aluminum electrodes in electroporation experiments“, *Bioelectrochem. and Bioenerg.*, **39**, 1996, 39-53.
- Pliquett, U., Pliquett, F., „Schnelle Impedanzmessungen an biologischen Geweben“, in Beckmann, D., Meister, M., Heiden, S., Erb, R., (Eds.), *Technische Systeme für Biotechnologie und Umwelt - Biosensorik und Zellkulturtechnik*, 2000, p.193 – 202.
- Pliquett, U., Schmeer, M., Seipp, T., Neumann, E., „Fast recovery process after electroporation“, *IFMBE Proc.*, **3,1**, 2002, 98-99.
- Pliquett, U., Elez, R., Piiper, A. and Neumann, E., „Electroporation of subcutaneous mouse tumor by rectangular and trapezium high voltage pulses“, *Bioelectrochem.*, **62**, 2004, 83-93.

Powell, K.T., Derrick, E.G., Weaver, J.C., „A quantitative theory of reversible electrical breakdown in bilayer membranes“, *Bioelektrochem. Bioenerg.*, **15**, 1986, 243-255.

Sale, A.J.H., Hamilton, W.A., „Effects of high electric fields on microorganisms; I. Killing of bacteria and yeasts“, *Biochim. Biophys. Acta*, **148**, 1967, 781-788.

Scott-Taylor, T.H., Pettengell, R., Clarke, I., Stuhler, G., La Barthe, M.C., Walden, P., Dalglish, A.G., „Human tumour and dendritic cell hybrids generated by electrofusion: potential of cancer vaccines“, *Biochim. Biophys. Acta*, **1500**, 2000, 265-279.

Schwan, H.P., „Electrical properties of tissue and cell suspensions“, in Lawrence, J.H., Tobias, C.A. (eds.), *Adv. Biol. Med. Phys.*, **5**, 1957, 147-209.

Seipp, T., „Elektroporativer Farbstofftransfer in Zellaggregaten von CHO-K1-Zellen“, *Diplomarbeit*, 2001.

Semrov, D., Miklavcic, D., „Calculation of the electrical parameters in electrochemotherapy of solid tumours in mice“, *Computers in Biology and Medicine*, **28**, 1998, 439-448.

Süß, R., Altmann, M., Pliquet, U., Lengerken, G.v., „Practicability and limits of carcass composition assessment by the use of impedance spectroscopy“, *Arch. Tierz.*, **44**, 2001, 361 – 369.

Sugar, I.P., Förster, W., Neumann, E., „Model of cell electrofusion, membrane electroporation, pore coalescence and percolation“, *Biophys. Chem.*, **26**, 1987, 321-335.

Sukharev, S.I., Klenchin, V.A., Serov, S.M., Chernomordik, L.V., Chizmadzhev, Yu.A., „Electroporation and electroporative DNA transfer into cells“, *Biophys. J.*, **63**, 1992, 1320-1327.

Tieleman, D., Leontiadou, H., Mark, A. and Marrink, S.-J., „Simulation of pore formation in lipid bilayers under mechanical and electrical stress“, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 2003, , 6382-6383.

Toensing, K., Schmeer, M., and Neumann, E., „Electroporative delivery of drugs and genes to cell aggregates by electrode arrays“, *Proc. 3rd. Internatl. Symp. Electrochem. Microsystem Techn.*, (AGEF, Düsseldorf) 2000, 67-68.

Tomov, T., Tsoneva, I., „Are the stainless steel electrodes inert ?“, *Bioelectrochem.*, **51**, 2000, 207-209.

Winterbourne, D.J., Thomas, S., Hermon-Taylor, J., Hussain, I., Johnstone, A.P., „Electric shock-mediated transfection of cells“, *Biochem. J.*, **251**, 1988, 427-434.

Zheng, Q., Chang, D.C., „High-efficiency gene transfection by in situ electroporation of cultured cells“, *Biocim. et Biophys. Acta*, **1088**, 1991, 104-110.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

$\bar{a}_c (\pm \sigma)$	mittlerer Zellradius (und Standardabweichung)
A_λ	optische Absorption (Absorbanz)
A_{260}	optische Absorption bei der Wellenlänge $\lambda = 260$ nm
C_m	spezifische Membrankapazität ($\mu\text{F} / \text{cm}^2$)
C_K	Kapazität des Kondensators (F)
CHO	Chinese Hamster Ovary, Eierstockzellen chinesischer Hamster
c_0	Konzentrationssumme der geschlossenen und porierten Membranzustände
d_m	Dicke der Zellmembran (≈ 5 nm)
D_j	Diffusionskoeffizient der Spezies j (cm^2 / s)
DMEM	Dolbecco's modified Eagle's Medium, Zellkulturmedium, Fertigmischung
E	elektrische Feldstärke
E_a	Arrhenius-Aktivierungsenergie / molare Aktivierungsenthalpie (J/mol)
E_{appl}	am Gerät eingestellte elektrische Feldstärke ($E_{\text{appl}} = U_{\text{appl}} / l_n$)
E_{in}	elektrische Feldstärke im Inneren des Zellaggregats ($E_{\text{in}} = U_{\text{in}} / l_{\text{in}}$)
E_m	Membranfeldstärke ($E_m = U_m / d_m = -\Delta\phi / d_m$)
E_{nom}	nominale elektrische Feldstärke
$E_{\text{th},i}$	apparenter Schwellenwert der elektrischen Feldstärke
F12	Zellkulturmedium (Fertigmischung)
FCS	fötales Kälberserum
f	Frequenz (Wechselfeld) in Hz
f_c	Anteil gefärbter Zellen bezogen auf die Zellgesamtheit
$f_{c,\text{GFP}}$	Anteil GFP exprimierender bezogen auf die überlebenden Zellen
$f_{c,\text{total}}$	Anteil gefärbter Zellen, transient und irreversibel permeabilisierte
$f_{c,\text{trans}}$	Anteil transient permeabilisierter Zellen bezogen auf die Zellgesamtheit
$f_{c,\text{irrev}}$	Anteil irreversibel geschädigter Zellen bezogen auf die Zellgesamtheit
f_{GFP}	Anteil GFP exprimierender bezogen auf die Zellgesamtheit
f_λ	Leitfähigkeitsterm
f_z	Volumenfraktion der Zellen in Suspension bzw. im Pellet
GFP	grün fluoreszierendes Protein
$\Delta_R \hat{G}^\ominus$	Standard-Gibbs-Reaktionsenergie elektrochemischer Prozesse (Legendre-transformiert)

$\Delta_R G_{el}^{\ominus}$	elektrischer Anteil der Standard-Gibbs-Reaktionsenergie
HV	Hochspannung (High Voltage)
K_i (K'_i)	(intrinsische) Gleichgewichtskonstante
k_B	Boltzmannkonstante (J/K)
$k_f(t_E)$	zeitabhängiger Effluxkoeffizient zum Zeitpunkt t_E ; $k_f(t_E) = 3 P_{f,3} f_3(t_E) / \bar{a}_c$
l'_{in}	Abstand der (inneren) Meßelektroden
l_n	Abstand der äußeren Elektroden
LV	Niederspannung (Low Voltage)
M_r	relative Molmasse ($M_r = M / (\text{g/mol})$)
$\Delta_r M^{\ominus}$	Standard-Reaktionsmoment
N	Anzahl Zellen
N_A	Avogadro-Konstante
N_p	Anzahl Membranporen
N_T	Gesamtzahl der Zellen einer Stichprobe
n^{in}	Stoffmenge bestimmter Moleküle oder Ionen in den Zellen
n^{out}	Stoffmenge bestimmter Moleküle oder Ionen im interstitiellen Medium
OD_{λ}	optische Dichte
P, P_2, P_3	porierte Membranzustände
P_P	Permeabilitätskoeffizient
P_y	aus Impedanzmessungen, proportional zum Anteil intakter Membranen
PI	Propidiumiodid ($M_r = 668,4$)
R	allgemeine Gaskonstante ($R = N_A \cdot k_B$)
RCF	relative Zentrifugalbeschleunigung (relative centrifugation factor)
SBG	Farbstoff Serva Blau G ($M_r = 854$)
T	absolute Temperatur (K)
t_{add}	Zugabezeitpunkt des Farbstoffes nach dem Puls
t_E	Pulsdauer
U_{appl}	applizierte Spannung
Y_i	relative Leitfähigkeitsänderung $\Delta\lambda_i/\lambda_0$ des Prozesses i
Y^{off}	relative Leitfähigkeitsänderung im Ausfeld durch Elektrolytaustritt (nach dem Puls)
ϵ_0	Permittivität des Vakuums
ϵ_w	Dielektrizitätszahl des Wassers ($\epsilon_w \approx 80$)

ϵ_L	Dielektrizitätszahl der Lipidschicht ($\epsilon_L \approx 2,3$)
ϵ_λ	molarer Extinktionskoeffizient in $A_\lambda = \epsilon_\lambda \cdot c \cdot l$
$\Delta\varphi_{ind}$	induzierte Potentialdifferenz (durch äußeres Feld)
$\Delta\varphi_m$	Transmembranpotentialdifferenz ($\Delta\varphi_m = -U_m$)
$\Delta\varphi_{nat}$	natürliches Membranpotential ($\Delta\varphi_{nat} = \varphi^{in} - \varphi^{out}$)
λ	Leitfähigkeit (S/cm)
λ_0	Leitfähigkeit bei $E_{appl} = 0$
λ_{ex}	Leitfähigkeit des extrazellulären Mediums (im Pellet)
λ_{eq}	Äquivalentleitfähigkeit
λ_{in}	Leitfähigkeit des intrazellulären Mediums
λ_m	Membranleitfähigkeit
λ_i	Leitfähigkeitbeitrag des Prozesses i
λ'_i	Leitfähigkeitbeitrag des Prozesses i, bereinigt um Mode (1)
ρ (ρ_0)	Zelldichte (Zelldichte vor Feldpulsapplikation)
τ_i	Normalmoden-Zeitkonstante des Prozesses i
τ'_i	intrinsische Zeitkonstante des Prozesses i
τ_R	Zeitkonstante der Porenausheilung $\tau_R \approx \tau_0^3$
θ	Winkel zwischen betrachtetem Punkt auf der Membran und der Feldrichtung
ω_β	Kreisfrequenz, $\omega_\beta = 2\pi f$

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. E. Neumann für die Überlassung des Themas und die Freiheit zur eigenständigen Bearbeitung, sowie die Unterstützung bei der theoretischen Aufarbeitung der Meßdaten.

Allen Kollegen aus der Arbeitsgruppe PC III danke ich für die stete freundliche Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ganz besonders danke ich Herrn Dipl. Chem. Thomas Seipp für die Zusammenarbeit bei der Durchführung der Elektroporationsexperimente, die Unterstützung bei der Zellkultur und viele hilfreiche Diskussionen.

Herrn PD Dr. Uwe Pliquet möchte ich danken für die Bereitstellung von Hard- und Software zur Durchführung und Auswertung der Leitfähigkeitsmessungen sowie für zahlreiche hilfreiche Diskussionen.

Herrn Dr. Sergej Kakorin danke ich für die Unterstützung bei der theoretischen Aufarbeitung der Meßdaten.

Frau Ina Ehring danke ich für die Assistenz bei der Zellkultur.

Bei der Arbeitsgruppe Zellkulturtechnik, Universität Bielefeld, bedanke ich mich ganz herzlich für die Einarbeitung in die Kultur von Säugerzellen und zahlreiche Hilfestellungen bei zellkulturtechnischen Fragen und Problemen.

Frau Dr. Katja Tönsing danke ich in die Einarbeitung in die Elektroporation biologischer Zellen und hilfreiche Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Gerisch und Frau Jana Köhler danke ich für die Zusammenarbeit bei der elektroporativen Zellfusion von *Dictyostelium discoideum* am MPI für Biochemie in Martinsried.

Herrn Prof. Müller und Herrn Dr. Johannes Wessels, Universitätsklinikum Göttingen, danke ich für die hoffentlich anhaltende fruchtbare Zusammenarbeit bei der elektroporativen Säugerzellfusion.

Zuletzt möchte ich mich besonders bei meiner Frau Regina, meinen Eltern und meiner Großmutter sowie meinen Schwiegereltern für die ständige Unterstützung und Hilfsbereitschaft bedanken.